

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/002457

International filing date: 04 March 2005 (04.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: EP
Number: 04090121.7
Filing date: 29 March 2004 (29.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 13 April 2005 (13.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

11.03.05

**Europäisches
Patentamt****European
Patent Office****Office européen
des brevets****Bescheinigung****Certificate****Attestation**

Die angehefteten Unterla-
gen stimmen mit der
ursprünglich eingereichten
Fassung der auf dem näch-
sten Blatt bezeichneten
europäischen Patentanmel-
dung überein.

The attached documents
are exact copies of the
European patent application
described on the following
page, as originally filed.

Les documents fixés à
cette attestation sont
conformes à la version
initialement déposée de
la demande de brevet
européen spécifiée à la
page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

04090121.7

Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

R C van Dijk



PCT/EP2005/002457

11.03.05

Anmeldung Nr:
Application no.: 04090121.7
Demande no:

Anmeldetag:
Date of filing: 29.03.04
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

Bayer CropScience GmbH
Brüningstrasse 50
65929 Frankfurt/Main
ALLEMAGNE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.
If no title is shown please refer to the description.
Si aucun titre n'est indiqué se référer à la description.)

Pflanzen mit verringerter Aktivität eines Stärke phosphorylierenden Enzyms

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s)
revendiquée(s)

Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/
Classification internationale des brevets:

A01H/

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten/Contracting states designated at date of
filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL
PL PT RO SE SI SK TR LI

Bayer CropScience GmbH

Pflanzen mit verringerter Aktivität eines Stärke phosphorylierenden Enzyms

5

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Pflanzenzellen und Pflanzen, die genetisch modifiziert sind, wobei die genetische Modifikation zur Verringerung der Aktivität eines Stärke phosphorylierenden OK1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen führt. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Mittel und Verfahren zur Herstellung solcher Pflanzenzellen und Pflanzen. Derartige Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren eine modifizierte Stärke. Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch die von den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisierte Stärke, Verfahren zur Herstellung dieser Stärke, sowie die Herstellung von Stärkederivaten dieser modifizierten Stärke, als auch Mehle, enthaltend erfindungsgemäße Stärken.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung Nucleinsäuremoleküle, die zur Herstellung erfindungsgemäßer Pflanzen geeignet sind.

20 Im Hinblick auf die zunehmende Bedeutung, die pflanzlichen Inhaltsstoffen als erneuerbaren Rohstoffquellen zur Zeit beigemessen wird, ist es eine der Aufgaben der biotechnologischen Forschung, sich um eine Anpassung dieser pflanzlichen Rohstoffe an die Anforderungen der verarbeitenden Industrie zu bemühen. Um eine Anwendung von nachwachsenden Rohstoffen in möglichst vielen Einsatzgebieten zu ermöglichen, ist es darüber hinaus erforderlich, eine große Stoffvielfalt zu erreichen.

Das Polysaccharid Stärke ist aus chemisch einheitlichen Grundbausteinen, den Glucosemolekülen, aufgebaut, stellt jedoch ein komplexes Gemisch unterschiedlicher Molekülformen dar, die Unterschiede hinsichtlich des

Polymerisations- und des Verzweigungsgrades aufweisen und sich somit in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften stark voneinander unterscheiden. Man differenziert zwischen Amylosestärke, einem im Wesentlichen unverzweigten Polymer aus alpha-1,4-glycosidisch verknüpften Glucoseeinheiten, und der
5 Amylopektinstärke, einem verzweigten Polymer, bei dem die Verzweigungen durch das Auftreten zusätzlicher alpha-1,6-glycosidischer Verknüpfungen zustande kommen. Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen Amylose und Amylopektin liegt im Molekulargewicht. Während Amylose, je nach Herkunft der Stärke, ein Molekulargewicht von $5 \times 10^5 - 10^6$ Da besitzt, liegt das des Amylopektins zwischen
10 10^7 und 10^8 Da. Die beiden Makromoleküle können durch ihr Molekulargewicht und ihre unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften differenziert werden, was am einfachsten durch ihre unterschiedlichen Jodbindungseigenschaften sichtbar gemacht werden kann.

15 Amylose wurde lange als lineares Polymer, bestehend aus alpha-1,4-glycosidisch verknüpften alpha-D-Glucose-Monomeren, angesehen. In neueren Studien wurde jedoch die Anwesenheit von alpha-1,6-glycosidischen Verzweigungspunkten (ca. 0,1%) nachgewiesen (Hizukuri und Takagi, Carbohydr. Res. 134, (1984), 1-10; Takeda et al., Carbohydr. Res. 132, (1984), 83-92).

20

Die funktionellen Eigenschaften, wie z.B. die Löslichkeit, das Retrogradationsverhalten, das Wasserbindevermögen, die Filmbildungseigenschaften, die Viskosität, die Verkleisterungseigenschaften, die Gefrier-Tau-Stabilität, die Säurestabilität, die Gelfestigkeit, die Stärkekorngröße von
25 Stärken werden u.a. durch das Amylose/Amylopektin-Verhältnis, das Molekulargewicht, das Muster der Seitenkettenverteilung, den Gehalt an Ionen, den Lipid- und Proteingehalt, die mittlere Stärkekorngröße die Stärkekornmorphologie etc. beeinflusst. Die funktionellen Eigenschaften von Stärke werden auch vom Phosphatgehalt, einer nicht-Kohlenstoffkomponente von Stärke, beeinflusst. Dabei
30 ist zwischen Phosphat, welches in Form von Monoestern kovalent an die Glucosemoleküle der Stärke gebundenen ist (im Folgenden als Stärkephosphat

bezeichnet) und Phosphat in Form von mit der Stärke assoziierten Phospholipiden zu unterscheiden.

Der Gehalt an Stärkephosphat variiert je nach Pflanzensorte. So synthetisieren z.B.
5 bestimmte Maismutanten eine Stärke mit erhöhtem Gehalt an Stärkephosphat (waxy-Mais 0,002% und Hoch-Amylose-Mais 0,013%), während herkömmliche Mais Sorten nur Spuren von Stärkephosphat aufweisen. Ebenfalls geringe Mengen an Stärkephosphat findet man in Weizen (0,001%) während in Hafer und Sorghum kein Stärkephosphat nachgewiesen werden konnte. In Reis-Mutanten wurde ebenfalls
10 weniger Stärkephosphat gefunden (waxy-Reis 0,003%), als in herkömmlichen Reissorten (0,013%). Signifikante Mengen von Stärkephosphat wurden in Knollen- oder Wurzelspeichestärke synthetisierenden Pflanzen wie z.B. Tapioca (0,008%), Süßkartoffel (0,011%), Pfeilwurz (0,021%) oder Kartoffel (0,089%) nachgewiesen. Die im Vorangegangenen zitierten prozentualen Werte für den Stärkephosphatgehalt
15 beziehen sich jeweils auf das Trockengewicht der Stärke und sind von Jane et al. (1996, Cereal Foods World 41 (11), 827-832) ermittelt worden.

Stärkephosphat kann in Form von Monoestern an der C-2, C-3 oder C-6 Position der polymerisierten Glucosemonomere vorliegen (Takeda und Hizukuri, 1971,
20 Starch/Stärke 23, 267-272). Die Phosphatverteilung des Phosphates in von Pflanzen synthetisierter Stärke zeichnet sich im Allgemeinen dadurch aus, dass etwa 30% bis 40% der Phosphatreste in C-3-Position und etwa 60% bis 70% der Phosphatreste in C-6-Position der Glucosemoleküle kovalent gebunden sind (Blennow et al., 2000, Int. J. of Biological Macromolecules 27, 211-218). Blennow et al. (2000, Carbohydrate
25 Polymers 41, 163-174) ermittelten einen Gehalt an Stärkephosphat, der in C-6 Position der Glukosemoleküle gebunden ist, für verschiedene Stärken, wie z.B. Kartoffelstärke (zwischen 7,8 und 33,5 nMol pro mg Stärke, je nach Sorte), Stärke aus verschiedenen *Curcuma* Spezies (zwischen 1,8 und 63 nMol pro mg), Tapiocastärke (2,5 nMol pro mg Stärke), Reisstärke (1,0 nMol pro mg Stärke),
30 Mungbohnenstärke (3,5 nMol pro mg Stärke) und Sorghumstärke (0,9 nMol pro mg Stärke). In Gerstenstärke und Stärke aus verschiedenen waxy-Mutanten von Mais

konnten diese Autoren kein an der C-6-Position gebundenes Stärkephosphat nachweisen. Bisher konnte kein Zusammenhang zwischen dem Genotyp einer Pflanze und dem Gehalt von Stärkephosphat hergestellt werden (Jane et al., 1996, Cereal Foods World 41 (11), 827-832). Daher ist es zurzeit nicht möglich, den Gehalt
5 an Stärkephosphat in Pflanzen durch züchterische Maßnahmen zu beeinflussen.

Bisher ist nur ein Protein beschrieben, welches die Einführung von kovalenten Bindungen von Phosphatresten an die Glucosemoleküle der Stärke vermittelt. Dieses Protein besitzt die enzymatische Aktivität einer alpha-Glucan-Wasser-Dikinase
10 (GWD, E.C.: 2.7.9.4) (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171), wird in der wissenschaftlichen Literatur häufig als R1 bezeichnet und ist an die Stärkekörner der Speicherstärke in Kartoffelknollen gebunden (Lorberth et al., 1998, Nature Biotechnology 16, 473-477). In der von R1 katalysierten Reaktion werden die Edukte
15 Produkten Glucan-Phosphat (Stärkephosphat), Monophosphat und Adenosinmonophosphat umgesetzt. Dabei wird der gamma-Phosphatrest des ATP auf Wasser und der beta-Phosphatrest des ATP auf das Glucan (Stärke) übertragen. R1 überträgt *in vitro* den beta-Phosphatrest von ATP auf die C-6- und die C-3-
20 Position der Glucosemoleküle von alpha-1,4-Glucanen. Das Verhältnis von C-6-Phosphat zu C-3 Phosphat, welches bei der *in vitro* Reaktion erhalten wird, entspricht dem Verhältnis, welches in Stärke, isoliert aus Pflanzen, vorliegt (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171). Da das Stärkephosphat in Kartoffelstärke zu etwa 70% in C-6-Position und zu etwa 30% in C-3-Position der Glucosemonomere der
25 Stärke gebunden vorliegt, bedeutet dies, dass R1 bevorzugt die C-6-Position der Glucosemoleküle phosphoryliert. Weiterhin ist für R1 u.a. durch Verwendung von Amylopektin aus Mais gezeigt worden, dass es alpha-1,4-Glucane phosphorylieren kann, welche noch kein kovalent gebundenes Phosphat enthalten (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171), d.h. R1 ist in der Lage, Phosphat *de novo* in alpha-1,4-Glucane einführen.

Nukleinsäuresequenzen und zu diesen korrespondierende Aminosäuresequenzen, codierend ein R1 Protein sind aus unterschiedlichen Spezies, wie z.B. Kartoffel (WO 97 11188, GenBank Acc.: AY027522, Y09533), Weizen (WO 00 77229, US 6,462,256, GenBank Acc.: AAN93923, GenBank Acc.: AR236165), Reis (GenBank
5 Acc.: AAR61445, GenBank Acc.: AR400814), Mais (GenBank Acc.: AAR61444, GenBank Acc.: AR400813), Soyabohne (GenBank Acc.: AAR61446, GenBank Acc.: AR400815), Citrus (GenBank Acc.: AY094062) und *Arabidopsis* (GenBank Acc.: AF312027) beschrieben.

- 10 Pflanzen, die eine reduzierte Aktivität eines R1 Proteins aufweisen, sind z.B. bei Lorberth et al. (1998, Nature Biotechnology 16, 473-477) und in WO 97 11188 beschrieben. Stärke, die aus diesen Pflanzen, die eine verringerte Aktivität eines R1 Proteins aufweisen, isoliert wurden, weisen signifikant verringerte Mengen an Stärkephosphat auf.

15

- Weitere Proteine, die eine Reaktion katalysieren, welche kovalent gebundene Phosphatgruppen in die Stärke einführen, sind bisher nicht beschrieben. Auch Enzyme, die bevorzugt Phosphatgruppen in C-3-Position und/oder C-2-Position der Glucosemoleküle von Stärke einführen, sind nicht bekannt. Damit stehen abgesehen
20 von der Verringerung des Gehaltes an Stärkephosphat in Pflanzen auch keine Möglichkeiten zur Verfügung, die Phosphorylierung von Stärke in Pflanzen gezielt zu beeinflussen, die Phosphatverteilung innerhalb der von Pflanzen synthetisierten Stärke zu verändern und/oder den Gehalt an Stärkephosphat weiter zu verringern.

- 25 Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zu Grunde, modifizierte Stärken mit verringertem Phosphatgehalt und/oder veränderter Phosphatverteilung sowie Pflanzenzellen und/oder Pflanzen, die eine solche modifizierte Stärke synthetisieren, als auch Verfahren und Mittel zur Erzeugung besagter Pflanzen und/oder Pflanzenzellen zur Verfügung zu stellen.

30

Somit betrifft die vorliegende Erfindung genetisch modifizierte Pflanzenzellen und genetisch modifizierte Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine verringerte Aktivität mindestens eines OK1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen aufweisen.

5

Die genetische Modifikation kann dabei jede genetische Modifikation sein, die zu einer Verringerung der Aktivität mindestens eines OK1 Proteins führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen oder Wildtyp-Pflanzen.

10

Pflanzen, die eine verringerte Aktivität eines OK 1 Proteins aufweisen, weisen einen Hoch Stärke (starch excess) Phänotyp auf. Weiterhin zeigen Pflanzen, die eine verringerte Aktivität eines OK1 Proteins aufweisen ein normales Wachstum, im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen, d.h. die Pflanzen werden durch die verringerte
15 Aktivität eines OK1 Proteins nicht in ihrem Wachstum behindert. Daher eignen sich Pflanzen, die eine verringerte Aktivität eines OK1 Proteins aufweisen für die Kultivierung in der Landwirtschaft, da sie mehr Stärke und damit mehr Kohlenhydrate enthalten und gleichzeitig keine Verringerung Wachstumsrate zeigen.

20 Der Begriff „Wildtyp-Pflanzenzelle“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass es sich um Pflanzenzellen handelt, die als Ausgangsmaterial für die Herstellung der erfindungsgemäßen Pflanzenzellen dienen, d.h. deren genetische Information, abgesehen von der eingeführten genetischen Modifikation, der einer erfindungsgemäßen Pflanzenzelle entspricht.

25

Der Begriff „Wildtyp-Pflanze“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass es sich um Pflanzen handelt, die als Ausgangsmaterial für die Herstellung der erfindungsgemäßen Pflanzen dienen, d.h. deren genetische Information, abgesehen von der eingeführten genetischen Modifikation, der einer
30 erfindungsgemäßen Pflanze entspricht.

Der Begriff „entsprechend“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass beim Vergleich von mehreren Gegenständen die betreffenden Gegenstände, die miteinander verglichen werden, unter gleichen Bedingungen gehalten wurden. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bedeutet der Begriff „entsprechend“ im Zusammenhang mit Wildtyp-Pflanzenzelle oder Wildtyp-Pflanze, dass die Pflanzenzellen oder Pflanzen, die miteinander verglichen werden, unter gleichen Kulturbedingungen aufgezogen wurden und dass sie ein gleiches (Kultur-) Alter aufweisen.

10

In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die genetische Modifikation der erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder der erfindungsgemäßen Pflanzen durch Mutagenese eines oder mehrerer Gene hervorgerufen. Die Art der Mutation ist dafür unerheblich, solange sie zu einer Reduktion der Aktivität eines OK1 Proteins führt.

15

Unter dem Begriff „Mutagenese“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung jegliche Art von eingeführten Mutationen verstanden werden, wie z.B. Deletionen, Punktmutationen (Nukleotidaustausche), Insertionen, Inversionen, Genkonversionen oder Chromosomentranslokation.

20

Die Mutation, die zur Verringerung der Aktivität mindestens eines endogenen OK1 Proteins führt, kann dabei durch den Einsatz chemischer Agenzien oder energiereicher Strahlung (z.B. Röntgen-, Neutronen-, Gamma- UV-Strahlung) erzeugt werden.

25

Agentien, die zur Erzeugung chemisch induzierter Mutationen eingesetzt werden können und die durch Einwirkung der entsprechenden Mutagene dabei entstehenden Mutationen sind z.B. beschrieben bei Ehrenberg und Husain, 1981, (Mutation Research 86, 1-113), Müller, 1972 (Biologisches Zentralblatt 91 (1), 31-48). Die Erzeugung von Reismutanten unter Verwendung von Gamma Strahlen, Ethyl-

30

Methan-Sulfonat (EMS), N-methyl-N-Nitrosurea oder Natriumazid (NaN_3) ist z.B. beschrieben in Jauhar und Siddiq (1999, Indian Journal of Genetics, 59 (1), 23-28), bei Rao (1977, Cytologica 42, 443-450), Gupta und Sharma (1990, Oryza 27, 217-219) und Satoh und Omura (1981, Japanese Journal of Breeding 31 (3), 316-326).

- 5 Die Erzeugung von Weizenmutanten unter Verwendung von NaN_3 bzw. Maleic hydrazide ist in Arora et al. (1992, Annals of Biology 8 (1), 65-69) beschrieben. Eine Übersicht zur Erzeugung von Weizenmutanten unter Verwendung von verschiedenen Arten energiereicher Strahlung und chemischer Agenzien ist in Scarascia-Mugnozza et al. (1993, Mutation Breeding Review 10, 1-28) dargestellt.
- 10 Svec et al. (1998, Cereal Research Communications 26 (4), 391-396) beschreibt die Anwendung von N-ethyl-N-Nitrosurea zur Erzeugung von Mutanten in Triticale. Die Verwendung von MMS (Methylmethansulfonsäure) und Gamma Strahlung zur Erzeugung von Hirsemutanten ist in Shashidhara et al. (1990, Journal of Maharashtra Agricultural Universities 15 (1), 20-23) beschrieben.

15

Die Herstellung von Mutanten in Pflanzenspezies, die sich hauptsächlich vegetativ vermehren, wurde z.B. für Kartoffeln, die eine veränderte Stärke produzieren (Hovenkamp-Hermelink et al. (1987, Theoretical and Applied Genetics 75, 217-221) und für Minze mit erhöhtem Ölertrag bzw. veränderter Ölqualität (Dwivedi et al., 2000, Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences 22, 460-463) beschrieben.

Alle diese Methoden sind grundsätzlich geeignet, die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen herzustellen.

- Das Auffinden von Mutationen in den entsprechenden Genen, insbesondere in
- 25 Genen codierend ein OK1 Protein, kann mit Hilfe von dem Fachmann bekannten Methoden geschehen. Insbesondere können hierzu Analysen, basierend auf Hybridisierungen mit Sonden (Southern Blot), der Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR), der Sequenzierung betreffender genomischer Sequenzen und die Suche nach einzelnen Nucleotidaustauschen angewandt
- 30 werden. Eine Methode, um Mutationen anhand von Hybridisierungsmustern zu identifizieren, ist z.B. die Suche nach Restriktionsfragment Längen-Unterschieden

(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) (Nam et al., 1989, The Plant Cell 1, 699-705; Leister and Dean, 1993, The Plant Journal 4 (4), 745-750). Eine auf PCR basierende Methode ist z.B. die Analyse von amplifizierten Fragment Längenunterschieden (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) (Castiglioni et al., 1998, Genetics 149, 2039-2056; Meksem et al., 2001, Molecular Genetics and Genomics 265, 207-214; Meyer et al., 1998, Molecular and General Genetics 259, 150-160). Auch die Verwendung von mit Restriktionsendonucleasen geschnittenen amplifizierten Fragmenten (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences, CAPS) kann zur Identifizierung von Mutationen herangezogen werden (Konieczny und Ausubel, 1993, The Plant Journal 4, 403-410; Jarvis et al., 1994, Plant Molecular Biology 24, 685-687; Bachem et al., 1996, The Plant Journal 9 (5), 745-753). Methoden zur Ermittlung von SNPs sind u.a. von Qi et al. (2001, Nucleic Acids Research 29 (22), e116) Drenkard et al. (2000, Plant Physiology 124, 1483-1492) und Cho et al. (1999, Nature Genetics 23, 203-207) beschrieben worden. Insbesondere sind Methoden, die es erlauben, viele Pflanzen innerhalb kurzer Zeit auf Mutationen in bestimmten Genen hin zu untersuchen, geeignet. Solch eine Methode, das sogenannte TILLING (Targetting Induced Local Lesions IN Genomes), ist von McCallum et al. (2000, Plant Physiology 123, 439-442) beschrieben worden.

- 20 Diese Methoden sind zur Identifizierung erfindungsgemäßer Pflanzenzellen und erfindungsgemäßer Pflanzen grundsätzlich geeignet.

Hoogkamp et al. (2000, Potato Research 43, 179-189) haben, ausgehend von einer mittels chemischer Mutagenese hergestellten Kartoffelmutante (*amf*), stabile monoploide Mutanten hergestellt. Diese Pflanzen synthetisieren kein aktives Enzym mehr für eine stärkekorngelundene Stärkesynthase (GBSS I) und produzieren daher eine amylosefreie Stärke. Die erhaltenen monoploiden Kartoffelpflanzen können als Ausgangsmaterial für weitere Mutagenesen eingesetzt werden, um Pflanzen zu identifizieren, die eine Stärke mit veränderten Eigenschaften synthetisieren. Nach entsprechenden Methoden können auch die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und

erfindungsgemäßen Pflanzen, die eine erfindungsgemäße Stärke produzieren, erzeugt, identifiziert und isoliert werden.

- Die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen weisen
- 5 eine Verringerung der Aktivität mindestens eines OK1 Proteins auf im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen.

- Der Begriff "Verringerung der Aktivität" bedeutet dabei im Rahmen der vorliegenden
- 10 Erfindung eine Verringerung der Expression endogener Gene, die OK1 Proteine codieren und/oder eine Verringerung der Menge an OK1 Protein in den Pflanzenzellen und/oder eine Verringerung der enzymatischen Aktivität von OK1 Protein in den Pflanzenzellen.

- 15 Die Verringerung der Expression kann beispielsweise bestimmt werden durch Messung der Menge an OK1 Protein codierenden Transkripten, z.B. durch Northern-Blot-Analyse oder RT-PCR. Eine Verringerung bedeutet dabei vorzugsweise eine Verringerung der Menge an Transkripten im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen um mindestens 50%, insbesondere um
- 20 mindestens 70%, bevorzugt um mindestens 85% und besonders bevorzugt um mindestens 95%.

- Die Verringerung der Menge an OK1 Protein, die eine verringerte Aktivität dieser Proteine in den betreffenden Pflanzenzellen zur Folge hat, kann beispielsweise
- 25 bestimmt werden durch immunologische Methoden wie Western-Blot-Analyse, ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) oder RIA (Radio Immune Assay). Eine Verringerung bedeutet dabei vorzugsweise eine Verringerung der Menge an OK1 Protein im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen um mindestens 50%, insbesondere um mindestens 70%, bevorzugt um mindestens
- 30 85% und besonders bevorzugt um mindestens 95%.

Methoden zur Herstellung von Antikörpern, die spezifisch mit einem bestimmten Protein reagieren, d.h. die spezifisch an besagtes Protein binden, sind dem Fachmann bekannt (siehe z.B. Lottspeich und Zorbas (Eds.), 1998, Bioanalytik, Spektrum akad, Verlag, Heidelberg, Berlin, ISBN 3-8274-0041-4). Die Herstellung solcher Antikörper wird von einigen Firmen (z.B. Eurogentec, Belgien) als Auftragsservice angeboten. Eine Möglichkeit zur Herstellung von Antikörpern, die mit einem OK1 Protein spezifisch reagieren, ist weiter unten beschrieben (siehe Beispiel 10).

10

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung soll unter dem Begriff „OK 1 Protein“ ein Protein verstanden werden, welches einen Phosphatrest von ATP auf bereits phosphorylierte Stärke (P-Stärke) überträgt. Stärken, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante weisen keine nachweisbaren Mengen an kovalent gebundenen Phosphatresten auf und werden von einem OK1 Protein nicht phosphoryliert, d.h. ein erfindungsgemäßes OK1 Protein benötigt bereits phosphorylierte Stärke als Substrat zur Übertragung weiterer Phosphatreste.

15

Bevorzugt wird von einem OK1 Protein der beta-Phosphatrest des ATP auf die Stärke und der gamma-Phosphatrest des ATP auf Wasser übertragen. Als weiteres Reaktionsprodukt entsteht bei einer durch ein OK1 Protein durchgeführten Phosphorylierungsreaktion von P-Stärke AMP (Adenosinmonophosphat). Ein OK1 Protein wird daher als [phosphoryliertes-alpha-1,4-Glucan]-Wasser-Dikinase ([P-alpha-1,4-Glucan]-Wasser-Dikinase) bzw. als [phosphorylierte-Stärke]-Wasser-Dikinase bezeichnet.

20

Bevorzugt entsteht an der durch ein OK1 Protein phosphorylierten P-Stärke eine zusätzliche Phosphatmonoesterbindung in C-6-Position und/oder in C-3-Position eines Glucosemoleküls der P-Stärke. Besonders bevorzugt entstehen bei der durch ein OK1 Protein katalysierten Phosphorylierung von P-Stärke mehr zusätzliche Phosphatmonoesterbindungen in C-3-Position im Vergleich zu Phosphatmonoesterbindungen in C-6-Position der Glucosemoleküle der betreffenden P-Stärke.

30

Aminosäuresequenzen, die OK1 Proteine codieren, enthalten eine Phosphohistidindomäne. Phosphohistidindomänen sind z.B. beschrieben bei Tien-Shin Yu et al. (2001, Plant Cell 13, 1907-1918). Bevorzugt enthalten Phosphohistidindomänen von OK1 Proteine codierenden Aminosäuren zwei
5 Histidine.

Bei der Katalyse einer Phosphorylierungsreaktion einer P-Stärke durch ein OK1 Protein entsteht als Zwischenprodukt ein phosphoryliertes OK1 Protein, bei welchem ein Phosphatrest des ATP kovalent an eine Aminosäure des OK1 Proteins gebunden ist. Das Zwischenprodukt entsteht durch Autophosphorylierung des OK1 Proteins,
10 d.h. das OK1 Protein selbst katalysiert die Reaktion, die zu dem Zwischenprodukt führt. Bevorzugt wird durch die Autophosphorylierung ein Histidinrest der Aminosäuresequenz, codierend ein OK1 Protein, phosphoryliert, besonders bevorzugt ein Histidinrest, der Bestandteil einer Phosphohistidindomäne ist.

Weiterhin weisen erfindungsgemäße OK1 Proteine eine erhöhte Bindungsaktivität zu
15 P-Stärke auf im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke.

Da bisher keine Enzyme beschrieben sind, die P-Stärke als Substrat benötigen, um diese weiter zu phosphorylieren, und die bevorzugt die C-3-Position der Glucosemoleküle von Stärke phosphorylieren, war es bisher auch nicht möglich, die
20 Verteilung des Stärkephosphates in Stärke zu beeinflussen. Die Aufklärung der Funktion eines OK1 Proteins und damit die Bereitstellung eines OK1 Proteins führt dazu, dass nun Pflanzen dahingehend genetisch modifiziert werden können, dass sie eine Stärke mit veränderten Eigenschaften synthetisieren. Das Verändern der Phosphatverteilung in von Pflanzen synthetisierter Stärke war aus Mangel an zur
25 Verfügung stehenden Mitteln bisher nicht möglich. Durch die Bereitstellung erfindungsgemäßer Proteine und Nucleinsäuren durch die vorliegende Erfindung ist nun auch eine Veränderung des Phosphatverhältnisses in nativen Stärken möglich.

Unter dem Begriff „erhöhte Bindungsaktivität“ soll im Zusammenhang mit der
30 vorliegenden Erfindung, eine erhöhte Affinität eines Proteins zu einem ersten Substrat im Vergleich zu einem zweiten Substrat verstanden werden. D.h., dass die

Menge an Protein, die unter gleichen Inkubationsbedingungen vermehrt an ein erstes Substrat im Vergleich zu einem zweiten Substrat bindet, eine erhöhte Bindungsaktivität zu dem ersten Substrat aufweist.

- 5 Unter dem Begriff „Stärkephosphat“ sollen im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung kovalent an die Glucosemoleküle von Stärke gebundene Phosphatgruppen verstanden werden.

- 10 Unter dem Begriff „nicht-phosphorylierte-Stärke“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Stärke verstanden werden, welche keine nachweisbaren Mengen an Stärkephosphat enthält. Zur Bestimmung der Menge an Stärkephosphat sind verschiedene Methoden beschrieben. Bevorzugt kann die bei Ritte et al. (2000, Starch/Stärke 52, 179-185) beschriebene Methode zur Bestimmung der Menge von Stärkephosphat verwendet werden. Besonders bevorzugt wird die Bestimmung der
15 Menge an Stärkephosphat mittels ^{31}P -NMR nach der bei Kasemusuwan und Jane (1996, Cereal Chemistry 73, 702-707) beschriebenen Methode durchgeführt.

- Unter dem Begriff „phosphorylierte-Stärke“ oder „P-Stärke“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Stärke verstanden werden, welche
20 Stärkephosphat enthält.

- Nachgewiesen werden kann die Aktivität eines OK1 Proteins z.B. durch *in vitro* Inkubation eines OK1 Proteins unter Verwendung von ATP, welches einen in der beta-Position markierten Phosphatrest enthält (markiertes ATP). Zu bevorzugen ist
25 ATP, bei welchem der Phosphatrest in beta-Position spezifisch markiert ist, d.h. bei welchem nur der Phosphatrest in beta-Position eine Markierung trägt. Bevorzugt wird radioaktiv markiertes ATP, besonders bevorzugt ATP, bei welchem der Phosphatrest in beta-Position spezifisch radioaktiv markiert ist und insbesondere bevorzugt wird ATP, bei welchem der Phosphatrest in beta-Position spezifisch mit ^{33}P markiert ist,
30 verwendet. Wird ein OK1 Protein mit markiertem ATP und Stärken, welche nicht

phosphoryliert sind, inkubiert, wird kein Phosphat durch OK1 auf die Stärke übertragen. Bevorzugt wird Blattstärke der *Arabidopsis thaliana* Mutante *sex1-3* (Tien-Shin Yu et al., 2001, Plant Cell 13, 1907-1918) verwendet.

- 5 Wird ein OK1 Protein hingegen mit P-Stärke in Gegenwart von markiertem ATP inkubiert, so kann anschließend kovalent an die P-Stärke gebundenes markiertes Phosphat nachgewiesen werden. Bevorzugt wird Stärke aus Blättern von *Arabidopsis thaliana*, besonders bevorzugt mittels eines R1 Proteins enzymatisch phosphorylierte Stärke aus *Arabidopsis thaliana sex1-3* Mutanten (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171) verwendet.
- 10 Nachgewiesen werden können markierte Phosphatreste, die durch ein OK1 Protein in P-Stärke eingebaut wurden z.B. durch Abtrennung der markierten P-Stärke (z.B. durch Ausfällen mittels Ethanol, Filtration, chromatographische Methoden etc.) vom Rest des Reaktionsgemisches und anschließender Detektion der markierten Phosphatreste in der P-Stärke Fraktion. Die in der P-Stärke Fraktion gebundenen
- 15 markierten Phosphatreste können dabei z.B. durch Bestimmung der Menge der in der P-Stärke Fraktion vorliegenden Radioaktivität (z.B. mittels Szintillationszähler) nachgewiesen werden. Mögliche Methoden zum Nachweis eines Proteins, welches P-Stärke als Substrat für eine Phosphorylierungsreaktion benötigt, ist weiter unten unter Allgemeine Methoden, Punkt 11 und in Beispiel 6 beschrieben.

20

- Welche Positionen der Kohlestoffatome (C-2, C-3 oder C-6) der Glucosemonomere in P-Stärke von einem OK1 Protein bevorzugt phosphoryliert werden, kann z.B. durch Analyse der durch ein Protein phosphorylierten P-Stärken wie bei Ritte et al. (2002, PNAS 99, 7166-7171) beschrieben, ermittelt werden. Hierzu wird durch ein
- 25 Protein phosphorylierte P-Stärke unter Verwendung von Säure hydrolysiert und anschließend mittels Anionenaustausch-Chromatographie analysiert.

- Bevorzugt wird die von einem OK1 Protein phosphorylierte P-Stärke mittels NMR analysiert, um festzustellen, welche Positionen der Kohlestoffatome (C-2, C-3 oder C-6) der Glucosemonomere in der P-Stärke phosphoryliert werden. Eine besonders
- 30 bevorzugte Methode zur Identifizierung der C-Atom-Positionen eines Glucosemoleküls einer Stärke, welche durch eine von einem OK1 Protein

katalysierte Reaktion phosphoryliert werden, ist weiter unten unter Allgemeine Methoden, Punkt 13 beschrieben.

5 Ein phosphoryliertes Protein, welches als Zwischenprodukt bei der durch ein OK1 Protein vermittelten Phosphorylierung von P-Stärke entsteht, kann wie z.B. bei Ritte et al. (2002, PNAS 99, 7166-7171) für ein R1 Protein beschrieben, nachgewiesen werden

10 Zum Nachweis des Vorliegens eines autophosphorylierten Zwischenproduktes wird ein OK1 Protein zunächst in Abwesenheit von Stärke mit markiertem ATP, bevorzugt mit spezifisch in beta-Phosphat-Position markiertem ATP, besonders bevorzugt mit spezifisch mit ^{33}P in beta-Phosphat-Position markiertem ATP inkubiert. Parallel dazu wird ein Reaktionsansatz 2, der jedoch an Stelle von markiertem ATP entsprechende Mengen nicht-markiertes ATP enthält, unter ansonsten gleichen Bedingungen
15 inkubiert. Anschließend wird nicht markiertes ATP dem Reaktionsgemisch 1 im Überschuß und eine Mischung aus nicht-markiertem ATP und markiertem ATP (gleiche Menge von markiertem ATP wie zuvor in Reaktionsgemisch 1 eingesetzt und gleiche Menge an nicht-markiertem ATP wie dem Reaktionsgemisch 1 im Überschuß zugesetzt) dem Reaktionsgemisch 2 hinzu gegeben und weiter inkubiert,
20 bevor zu einem Teil A des Reaktionsgemisches 1 (Teil 1A) bzw. zu einem Teil A des Reaktionsgemisches 2 (Teil 2A) P-Stärke hinzu gegeben werden. Die Reaktion im verbleibenden Teil 1B und Teil 2B des Reaktionsgemisches wird durch Denaturieren des Proteins gestoppt. Das Stoppen des Teils B der Reaktionsgemische kann durch dem Fachmann bekannte Methoden, welche zur Denaturierung von Proteinen
25 führen, bevorzugt durch Zugabe von Natriumlaurylsulfat (SDS) erfolgen. Teil 1A und Teil 2A der Reaktionsgemische werden für mindestens weitere 10 Minuten inkubiert, bevor auch diese Reaktionen gestoppt werden. Die in Teil A bzw. Teil B der jeweiligen Reaktionsgemische vorliegende Stärke wird vom jeweiligen Rest der Reaktionsgemische abgetrennt. Findet die Abtrennung der jeweiligen Stärke z.B.
30 durch Zentrifugation statt, so befindet sich die Stärke des jeweiligen Teils A bzw. jeweiligen Teils B der Reaktionsgemische nach erfolgter Zentrifugation im

sedimentierten Pellet und die sich in den jeweiligen Reaktionsgemischen befindlichen Proteine befinden sich im jeweiligen Zentrifugationsüberstand. Der Überstand des Teils 1A bzw. 2A und des Teils 1B bzw. 2B der Reaktionsgemische kann anschließend z.B. jeweils in einer denaturierenden Acrylamidgelelektrophorese, gefolgt von einer Autoradiographie des erhaltenen Acrylamidgels analysiert werden. Zur Quantifizierung der Menge an radioaktiv markierten Proteinen, die mittels Acrylamidgelelektrophorese aufgetrennt wurden, kann z.B. die dem Fachmann bekannte Methode des so genannten „Phosphoimaging“ verwendet werden. Zeigt die Autoradiographie oder die Analyse mittels „Phosphoimager“ von Proteinen im Zentrifugationsüberstand des Teil B des Reaktionsgemisches 1 ein gegenüber dem Zentrifugationsüberstand des Teil A des Reaktionsgemisches 1 ein signifikant erhöhtes Signal, so zeigt dieses, dass das eine Phosphorylierung von Stärke vermittelnde Protein als autophosphoryliertes Zwischenprodukt auftritt. Die Teile A und B des Reaktionsgemisches 2 dienen als Kontrolle und sollten daher im Zentrifugationsüberstand kein signifikant erhöhtes Signal in der Autoradiographie oder in der Analyse mittels „Phosphoimager“ aufweisen.

Zusätzlich kann die im jeweiligen sedimentierten Pellet verbliebene Stärke des jeweiligen Teils A der Reaktionsgemische 1 und 2, gegebenenfalls nach anschließendem Waschen der jeweiligen Stärken, auf das Vorliegen von Stärkephosphat, welches eine dem eingesetzten markierten ATP entsprechende Markierung aufweist, hin untersucht werden. Enthalten die Stärken des Teils A des Reaktionsgemisches 1 markierte Phosphatreste und zeigt, die Autoradiographie des Zentrifugationsüberstandes des Teil B des Reaktionsgemisches 1 ein gegenüber dem Zentrifugationsüberstand des Teil A des Reaktionsgemisches 1 ein signifikant erhöhtes Signal in der Autoradiographie, so zeigt dieses, dass das eine Phosphorylierung von Stärke vermittelnde Protein als autophosphoryliertes Zwischenprodukt vorliegt. Die Teile A und B des Reaktionsgemisches 2 dienen als Kontrolle und sollten daher im sedimentierten Pellet, enthaltend alpha-1,4-Glucose, kein signifikant erhöhtes Signal für mit ^{33}P markierte alpha-1,4-Glucose aufweisen. Möglichkeiten zum Nachweis eines phosphorylierten OK1 Protein Zwischenproduktes sind weiter unten unter Allgemeine Methoden Punkt 12 und in Beispiel 7 beschrieben.

Dass ein OK1 Protein eine erhöhte Bindungsaktivität zu einer P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweist, kann durch Inkubation des OK1 Proteins mit P-Stärke und nicht-phosphorylierter-Stärke in jeweils getrennten Ansätzen
5 erfolgen.

Zur Inkubation von OK1 Proteinen mit nicht-phosphorylierter-Stärke sind grundsätzlich alle nicht-phosphorylierten-Stärken geeignet. Bevorzugt wird eine nicht-phosphorylierte pflanzliche Stärke, besonders bevorzugt Weizenstärke und insbesondere bevorzugt granuläre Blattstärke einer *Arabidopsis thaliana* Mutante
10 *sex1-3* verwendet.

Methoden z.B. zur Isolierung von Stärke aus Pflanzen sind dem Fachmann bekannt. Alle dem Fachmann bekannten Methoden sind grundsätzlich geeignet, um nicht-phosphorylierte-Stärke aus entsprechenden Pflanzenspezies zu isolieren. Bevorzugt wird die weiter unten (siehe Allgemeine Methoden Punkt 2) beschriebene Methode
15 zur Isolierung von nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen verwendet.

Zur Inkubation von OK1 Proteinen mit P-Stärke sind grundsätzlich alle Stärken geeignet, die Stärkephosphat enthalten. Auch chemisch phosphorylierte Stärken können hierbei verwendet werden. Vorzugsweise werden zur Inkubation mit OK1
20 Proteinen P-Stärken eingesetzt, besonders bevorzugt eine nachträglich enzymatisch phosphorylierte pflanzliche Stärke, insbesondere bevorzugt eine nachträglich enzymatisch phosphorylierte pflanzliche granuläre Stärke, die aus einer *sex-1* Mutante von *Arabidopsis thaliana* isoliert wurde.

25 Zum Nachweis einer erhöhten Bindungsaktivität von OK1 Proteinen zu P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke werden OK1 Proteine in voneinander getrennten Ansätzen mit P-Stärke (Ansatz A) und mit nicht-phosphorylierter-Stärke (Ansatz B) inkubiert. Nach erfolgter Inkubation werden die nicht an die betreffenden Stärken der Ansätze A und B gebundenen Proteine von den Stärken und den an sie
30 gebundenen Proteinen abgetrennt. Die Bindung zwischen den Proteinen und der P-Stärke im Ansatz A und die Bindung zwischen den Proteinen und nicht-

phosphorylierter-Stärke im Ansatz B wird anschließend aufgehoben, d.h. die betreffenden Proteine werden in Lösung gebracht. Die in Lösung gebrachten Proteine des Ansatzes A und des Ansatzes B können dann von den betreffenden Stärken, die in den entsprechenden Ansätzen vorliegen, abgetrennt werden.

- 5 Daraufhin kann eine Auftrennung der isolierten P-Stärke-bindenden-Proteine des Ansatzes A bzw. der isolierten nicht-phosphorylierte-Stärke-bindenden-Proteine des Ansatzes B, mit Hilfe von dem Fachmann bekannten Methoden, wie z.B. Gelfiltration, chromatographische Verfahren, Elektrophorese, SDS-Acrylamidgelelektrophorese etc. erfolgen. Durch Vergleich der Mengen aufgetrennter Proteine des Ansatzes A
- 10 mit den Mengen korrespondierender aufgetrennter Proteine des Ansatzes B, kann ermittelt werden, ob ein Protein eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierten-Stärke aufweisen. Methoden, mit welchen eine bevorzugte Bindung von Proteinen an P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke nachgewiesen werden kann, sind weiter unten in Beispiel 6
- 15 beschrieben.

Die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz codiert ein OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* und die unter SEQ ID NO 4 dargestellte Aminosäuresequenz codiert ein OK 1 Protein aus *Oryza sativa*.

20

- In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weisen Aminosäuresequenzen codierend ein OK1 Proteine eine Identität mit der in SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Sequenz eine Identität von mindestens 60%, insbesondere von mindestens 70%, bevorzugt von mindestens 80% und besonders
- 25 bevorzugt von mindestens 90% und insbesondere bevorzugt von mindestens 95% auf.

- In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weist das OK1 Protein eine Phosphohistidindomäne auf (Tien-Shin Yu et al., 2001, Plant Cell 13, 1907-
- 30 1918). Aminosäuresequenzen, codierend OK1 Proteine, enthalten eine Phosphohistidindomäne, die zu der unter SEQ ID NO 5 dargestellten

Aminosäuresequenz der Phosphohistidindomäne des OK1 Proteins aus *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* eine Identität von mindestens 50%, insbesondere von mindestens 60%, bevorzugt von mindestens 70% und besonders bevorzugt von mindestens 80% und insbesondere bevorzugt von mindestens 90% aufweist.

5

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein OK1 Protein, welches eine Phosphohistidindomäne aufweist. Bevorzugt enthält die Phosphohistidindomäne zwei Histidinreste.

10 Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft eine erfindungsgemäße genetisch modifizierte Pflanzenzelle oder eine erfindungsgemäße genetisch modifizierte Pflanze, wobei die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls in das Genom der Pflanze besteht.

15 In diesem Zusammenhang bedeutet der Begriff „genetische Modifikation“ das Einführen von homologen und/oder heterologen fremden Nucleinsäuremolekülen in das Genom einer Pflanzenzelle oder in das Genom einer Pflanze, wobei besagtes Einführen dieser Moleküle zur Verringerung der Aktivität eines OK1 Proteins führt.

Durch Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls sind die erfindungsgemäßen
20 Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen in ihrer genetischen Information verändert. Das Vorhandensein oder die Expression des fremden Nucleinsäuremoleküls führt zu einer phänotypischen Veränderung. „Phänotypische“ Veränderung bedeutet dabei vorzugsweise eine messbare Veränderung einer oder
25 erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die genetisch modifizierten erfindungsgemäßen Pflanzen aufgrund des Vorhandenseins oder bei Expression des eingeführten Nucleinsäuremoleküls eine Verringerung der Aktivität eines OK1 Proteins.

Unter dem Begriff "fremdes Nukleinsäuremolekül" versteht man im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein solches Molekül, das entweder natürlicherweise in entsprechenden Wildtyp-Pflanzenzellen nicht vorkommt, oder das in der konkreten räumlichen Anordnung nicht natürlicherweise in Wildtyp-Pflanzenzellen vorkommt
5 oder das an einem Ort im Genom der Wildtyp-Pflanzenzelle lokalisiert ist, an dem es natürlicherweise nicht vorkommt. Bevorzugt ist das fremde Nukleinsäuremolekül ein rekombinantes Molekül, das aus verschiedenen Elementen besteht, deren Kombination oder spezifische räumliche Anordnung natürlicherweise in pflanzlichen Zellen nicht auftritt.

- 10 Prinzipiell kann das fremde Nucleinsäuremolekül jedes beliebige Nucleinsäuremolekül sein, das in der Pflanzenzelle oder Pflanze eine Erhöhung der Aktivität eines OK1 Proteins bewirkt.

- Unter dem Begriff „Genom“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung
15 die Gesamtheit des in einer pflanzlichen Zelle vorliegenden Erbmaterials verstanden werden. Dem Fachmann ist bekannt, dass neben dem Zellkern auch andere Kompartimente (z.B. Plastiden, Mitochondrien) Erbmaterial enthalten.

- In einer weiteren Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und
20 die erfindungsgemäßen Pflanzen dadurch gekennzeichnet, dass das fremde Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein codiert, bevorzugt ein OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* oder ein OK1 Protein aus *Oryza sativa*.

- In einer weiteren Ausführungsform codiert das fremde Nucleinsäuremolekül ein OK1
25 Protein mit der in SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz.

- Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle steht eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher
30 Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten,

die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung der DNA mittels des biolistischen Ansatzes sowie weitere Möglichkeiten.

Die Verwendung der Agrobakterien-vermittelten Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120516; Hoekema, IN: The Binary

- 5 Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V. Alblasterdam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant Sci. 4, 1-46 und bei An et al. EMBO J. 4, (1985), 277-287 beschrieben worden. Für die Transformation von Kartoffel, siehe z.B. Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8, (1989), 29-33).

- 10 Auch die Transformation monokotyler Pflanzen mittels auf *Agrobacterium* Transformation basierender Vektoren wurde beschrieben (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22, (1993), 491-506; Hiei et al., Plant J. 6, (1994) 271-282; Deng et al, Science in China 33, (1990), 28-34; Wilmink et al., Plant Cell Reports 11, (1992), 76-80; May et al., Bio/Technology 13, (1995), 486-492; Conner und Domisse, Int. J. Plant Sci. 153 (1992), 550-555; Ritchie et al, Transgenic Res. 2, (1993), 252-265). Alternatives
15 System zur Transformation von monokotylen Pflanzen ist die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes (Wan und Lemaux, Plant Physiol. 104, (1994), 37-48; Vasil et al., Bio/Technology 11 (1993), 1553-1558; Ritala et al., Plant Mol. Biol. 24, (1994), 317-325; Spencer et al., Theor. Appl. Genet. 79, (1990), 625-631), die
20 Protoplastentransformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, die Einbringung von DNA mittels Glasfasern. Insbesondere die Transformation von Mais wird in der Literatur mehrfach beschrieben (vgl. z. B. WO95/06128, EP0513849, EP0465875, EP0292435; Fromm et al., Biotechnology 8, (1990), 833-844; Gordon-Kamm et al., Plant Cell 2, (1990), 603-618; Koziel et al., Biotechnology 25 11 (1993), 194-200; Moroc et al., Theor. Appl. Genet. 80, (1990), 721-726).

Auch die erfolgreiche Transformation anderer Getreidearten wurde bereits beschrieben, z.B. für Gerste (Wan und Lemaux, s.o.; Ritala et al., s.o.; Krens et al., Nature 296, (1982), 72-74) und für Weizen (Nehra et al., Plant J. 5, (1994), 285-297; Becker et al., 1994, Plant Journal 5, 299-307). Alle vorstehenden Methoden sind im

- 30 Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet.

Pflanzenzellen und Pflanzen, die durch Einführung eines OK1 Proteins genetisch modifiziert sind, lassen sich von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen unter anderem dadurch unterscheiden, dass sie ein fremdes Nucleinsäuremolekül enthalten, das natürlicherweise in Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen nicht
5 vorkommt oder dadurch, dass ein solches Molekül an einem Ort im Genom der erfindungsgemäßen Pflanzenzelle oder im Genom der erfindungsgemäßen Pflanze integriert vorliegt, an dem es bei Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen nicht vorkommt, d.h. in einer anderen genomischen Umgebung. Ferner lassen sich derartige erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen von
10 Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen dadurch unterscheiden, dass sie mindestens eine Kopie des fremden Nucleinsäuremoleküls stabil integriert in ihr Genom enthalten, gegebenenfalls zusätzlich zu natürlicherweise in den Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen vorkommenden Kopien eines solchen Moleküls. Handelt es sich bei dem (den) in die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen
15 oder erfindungsgemäßen Pflanzen eingeführten fremden Nucleinsäuremolekül(en) um zusätzliche Kopien zu bereits natürlicherweise in den Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen vorkommenden Molekülen, so lassen sich die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen insbesondere dadurch unterscheiden,
20 dass diese zusätzliche(n) Kopie(n) an Orten im Genom lokalisiert ist (sind), an denen sie bei Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen nicht vorkommt (vorkommen). Dies lässt sich beispielsweise mit Hilfe einer Southern Blot-Analyse nachprüfen.

Weiterhin lassen sich die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen
25 vorzugsweise durch mindestens eines der folgenden Merkmale unterscheiden: Ist das eingeführte fremde Nucleinsäuremolekül heterolog in Bezug auf die Pflanzenzelle oder Pflanze, so weisen die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen Transkripte der eingeführten Nucleinsäuremoleküle auf. Diese lassen sich z. B. durch Northern-Blot-Analyse oder durch RT-PCR
30 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) nachweisen. Erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen, die ein Antisense- und/oder ein RNAi-Transkript exprimieren, können z.B. mit Hilfe von spezifischen Nucleinsäure-

Sonden, die komplementär zur der für das Protein codierenden (natürlich in der Pflanzenzelle vorkommenden) RNA sind, nachgewiesen werden. Vorzugsweise enthalten die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen ein Protein, das durch ein eingeführtes Nucleinsäuremolekül codiert wird.

- 5 Dies kann z. B. durch immunologische Methoden, insbesondere durch eine Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden.

- Ist das eingeführte fremde Nucleinsäuremolekül homolog in Bezug auf die Pflanzenzelle oder Pflanze, können die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen
10 beispielsweise aufgrund der zusätzlichen Expression der eingeführten fremden Nucleinsäuremoleküle unterschieden werden. Die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen enthalten vorzugsweise Transkripte der fremden Nucleinsäuremoleküle. Dies kann z. B. durch Northern-Blot-Analyse oder mit Hilfe der so genannten quantitativen PCR nachgewiesen werden.

15

In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und bei den erfindungsgemäßen Pflanzen um transgene Pflanzenzellen bzw. transgene Pflanzen.

- 20 In einer weiteren Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein fremdes Nucleinsäuremolekül Aminosäuresequenzen codiert, die von einer Aminosäuresequenz umfasst sind, welche ein OK1 Protein codieren.

- 25 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen wobei das fremde Nucleinsäuremolekül ausgewählt ist, aus der Gruppe bestehend aus

- a) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein mit der unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz codieren;

- b) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, das die Aminosäuresequenz umfasst, die von der Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder der Insertion in Plasmid pMI50 codiert wird;
- 5 c) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, dessen Sequenz eine Identität von mindestens 60% zu der unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz aufweisen;
- d) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, dessen Sequenz eine Identität von mindestens 60% zu der Aminosäuresequenz aufweist; die von der codierenden Region der Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder von der
10 codierenden Region der Insertion in Plasmid pMI50 codiert wird;
- e) Nucleinsäuremolekülen, die die unter SEQ ID NO 1 oder SEQ ID NO 3 dargestellte Nucleotidsequenz oder eine komplementäre Sequenz umfassen;
- f) Nucleinsäuremolekülen, die die Nucleotidsequenz der im Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder Plasmid pMI50 enthaltenen Insertion umfassen;
- 15 g) Nucleinsäuremolekülen, welche zu den unter a), b), d) oder e) beschriebenen Nucleinsäuresequenzen eine Identität von mindestens 70% aufweisen;
- h) Nucleinsäuremolekülen, welche mit mindestens einem Strang der unter a), b), e) oder f) beschriebenen Nucleinsäuremolekülen unter stringenten Bedingungen hybridisieren;
- 20 i) Nucleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der unter a), b), e) oder f) genannten Nucleinsäuremoleküle abweicht; und
- j) Nucleinsäuremolekülen, die Fragmente, allelische Varianten und/oder Derivate der unter a), b), c), d), e), f), g), h) oder i) genannten Nucleinsäuremoleküle darstellen.
25

Die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz codiert ein OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* und die in SEQ ID NO 4 dargestellte Aminosäuresequenz codiert ein OK1 Protein aus *Oryza sativa*.

Die von den verschiedenen Varianten der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codierten Proteine weisen bestimmte gemeinsame Charakteristika auf. Dazu können z.B. biologische Aktivität, Molekulargewicht, immunologische Reaktivität, Konformation etc. gehören, sowie physikalische Eigenschaften wie z.B. das Laufverhalten in Gelelektrophoresen, chromatographisches Verhalten, Sedimentationskoeffizienten, Löslichkeit, spektroskopische Eigenschaften, Stabilität; pH-Optimum, Temperatur-Optimum etc..

Das von der unter SEQ ID NO 2 dargestellten Aminosäuresequenz abgeleitete Molekulargewicht des OK1 Proteins aus *Arabidopsis thaliana* beträgt ca. 131 kDa und das von der unter SEQ ID NO 4 dargestellten Aminosäuresequenz abgeleitete Molekulargewicht des OK1 Proteins aus *Oryza sativa* beträgt ca. 132 kDa. Das von der codierenden Aminosäuresequenz abgeleitete Molekulargewicht eines erfindungsgemäßen Proteins liegt daher vorzugsweise im Bereich von 120 kDa bis 145 kDa, bevorzugt von 120 kDa bis 140 kDa, besonders bevorzugt von 125 kDa bis 140 kDa, insbesondere bevorzugt von 130 kDa bis 135 kDa.

Die in SEQ ID NO 2 und SEQ ID NO 4 dargestellten Aminosäuresequenzen codierend OK1 Proteine aus *Arabidopsis thaliana* bzw. *Oryza sativa* enthalten jeweils eine Phosphohistidindomäne. Bevorzugt enthält daher ein erfindungsgemäßes OK 1 Protein eine Phosphohistidindomäne, welche zu der unter SEQ ID NO 5 dargestellten Phosphohistidindomäne eine Identität von mindestens 50%, bevorzugt von mindestens 60%, besonders bevorzugt von mindestens 80% und insbesondere bevorzugt von mindesten 90% aufweist.

Die vorliegende Erfindung betrifft Nucleinsäuremoleküle, die ein Protein mit der erfindungsgemäßen enzymatischen Aktivität eines OK1 Proteins codieren, wobei das codierte OK1 Protein eine Identität von mindestens 70% bevorzugt von mindestens 80%, besonders bevorzugt von mindestens 90% und insbesondere bevorzugt von mindestens 95% zu den unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenzen aufweist.

Das Plasmid A.t.-OK1-pGEM, enthaltend eine cDNA, die ein OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* codiert, wurde am 08.03.2004 unter der Nummer DSM16264 und das Plasmid pMI50, enthaltend eine cDNA, die ein OK1 Protein aus *Oryza sativa* codiert, wurde am 24.03.2004 unter der Nummer DSM16302 nach dem Budapester

- 5 Vertrag hinterlegt bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Deutschland. Die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz kann von der codierenden Region der in Plasmid A.t.-OK1-pGEM integrierten cDNA Sequenz abgeleitet werden und codiert für ein OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana*. Die in SEQ ID NO 4
- 10 dargestellte Aminosäuresequenz kann von der codierenden Region der in Plasmid pMI50 integrierten cDNA Sequenz abgeleitet werden und codiert für ein OK1 Protein aus *Oryza sativa*. Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch Nucleinsäuremoleküle, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität eines OK1 Proteins codieren, das die Aminosäuresequenz umfasst, die von der Insertion in
- 15 Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder die von der Insertion in Plasmid pMI50 codiert wird, wobei das codierte Protein eine Identität von mindestens 70% bevorzugt von mindestens 80%, besonders bevorzugt von mindestens 90% und insbesondere bevorzugt von 95% zu der Aminosäuresequenz, die von der Insertion in A.t.-OK1-pGEM oder pMI50 abgeleitet werden kann, aufweist.

20

Die in SEQ ID NO 1 dargestellte Nucleinsäuresequenz ist eine cDNA Sequenz, die die codierende Region für ein OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* und die in SEQ ID NO 3 dargestellte Nucleinsäuresequenz ist eine cDNA Sequenz, die die codierende Region für ein OK1 Protein aus *Oryza sativa* umfasst.

- 25 Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch Nucleinsäuremoleküle, die ein OK1 Protein codieren und die codierende Region der unter SEQ ID NO 1 oder SEQ ID NO 3 dargestellten Nucleotidsequenzen oder zu diesen komplementäre Sequenzen umfassen, Nucleinsäuremoleküle, die die codierende Region der Nucleotidsequenz der im Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder im Plasmid pMI50 enthaltenen Insertion
- 30 umfassen und Nucleinsäuremoleküle, die zu den genannten Nucleinsäuremolekülen eine Identität von mindestens 70%, bevorzugt von mindestens 80%, besonders

bevorzugt von mindestens 90% und insbesondere bevorzugt von mindestens 95% aufweisen.

Mit Hilfe der Sequenzinformation erfindungsgemäßer Nucleinsäuremoleküle bzw. mit Hilfe eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls ist es dem Fachmann nun
5 möglich, homologe Sequenzen aus anderen Pflanzenspezies, vorzugsweise aus Stärke speichernden Pflanzen, bevorzugt aus Pflanzenspezies der Gattung *Oryza*, insbesondere *Oryza sativa* oder aus *Arabidopsis thaliana* zu isolieren. Dies kann beispielsweise mit Hilfe konventioneller Methoden, wie dem Durchmustern von cDNA oder genomischen Banken mit geeigneten Hybridisierungsproben erfolgen. Dem
10 Fachmann ist bekannt, dass die Isolierung homologer Sequenzen auch mit Hilfe von (degenerierten) Oligonucleotiden und der Verwendung von PCR basierten Methoden erfolgen kann.

Auch die Durchmusterung von Datenbanken wie sie z.B. von EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/index.htm>) oder NCBI (National Center for Biotechnology
15 Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) zur Verfügung gestellt werden, kann zur Identifizierung von homologen Sequenzen, die für OK1 Protein codieren, dienen. Hierbei wird eine oder werden mehrere Sequenzen als so genannte Abfrage (= query) vorgegeben. Diese Abfragesequenz wird dann mittels statistischen Computerprogrammen mit Sequenzen, die in den ausgewählten Datenbanken
20 enthalten sind, verglichen. Solche Datenbankabfragen (z.B. blast- oder fasta searches) sind dem Fachmann bekannt und können bei verschiedenen Anbietern durchgeführt werden.

Wird eine solche Datenbankabfrage z.B. beim NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt, so sollen die
25 Standardeinstellungen, die für die jeweilige Vergleichsanfrage vorgegeben sind, benutzt werden. Für Proteinsequenzvergleiche (blastp) sind dieses folgende Einstellungen: Limit entrez = nicht aktiviert; Filter = low complexity aktiviert; Expect value = 10; word size = 3; Matrix = BLOSUM62; Gap costs: Existence = 11, Extension = 1.

Für Nucleinsäuresequenzvergleich (blastn) sind folgende Parameter einzustellen:
Limit entrez = nicht aktiviert; Filter = low complexity aktiviert; Expect value = 10; word
size = 11.

Bei einer solchen Datenbankrecherche können z.B. die in der vorliegenden Erfindung
5 beschriebenen Sequenzen als Abfragesequenz (query) verwendet werden, um
weitere Nucleinsäuremoleküle und/oder Proteine zu identifizieren, die ein OK1
Protein codieren.

Mit Hilfe der beschriebenen Methoden ist es auch möglich, erfindungsgemäße
Nucleinsäuremoleküle zu identifizieren und/oder zu isolieren, die mit der unter SEQ
10 ID NO 1 oder unter SEQ ID NO 3 angegebenen Sequenz hybridisieren und die ein
OK1 Protein codieren.

Der Begriff "Hybridisierung" bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine
Hybridisierung unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise
unter stringenten Bedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrook et al. (Molecular
15 Cloning, A Laboratory Manual, 3rd edition (2001) Cold Spring Harbour Laboratory
Press, Cold Spring Harbour, NY. ISBN: 0879695773, Ausubel et al., Short Protocols
in Molecular Biology, John Wiley & Sons; 5th edition (2002), ISBN: 0471250929)
beschrieben sind. Besonders bevorzugt bedeutet "Hybridisierung" eine
Hybridisierung unter den folgenden Bedingungen:

20 Hybridisierungspuffer:

2xSSC; 10xDenhardt-Lösung (Fikoll 400+PEG+BSA; Verhältnis 1:1:1); 0,1%
SDS; 5 mM EDTA; 50 mM Na₂HPO₄; 250 µg/ml Heringssperma DNA; 50 µg/ml
tRNA; oder

25 M Natriumphosphatpuffer pH 7,2; 1 mM EDTA; 7% SDS

25 Hybridisierungstemperatur:

T=65 bis 68°C

Waschpuffer: 0,1xSSC; 0,1% SDS

Waschtemperatur: T=65 bis 68°C.

Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisieren, können prinzipiell aus jeder beliebigen Pflanzenspezies stammen, die ein entsprechendes Protein codiert, vorzugsweise stammen sie aus Stärke speichernden Pflanzen, bevorzugt aus Spezies der (systematischen) Familie *Poacea*, insbesondere bevorzugt aus *Oryza sativa*. Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Molekülen hybridisieren, können z.B. aus genomischen oder aus cDNA-Bibliotheken isoliert werden. Die Identifizierung und Isolierung derartiger Nucleinsäuremoleküle kann dabei unter Verwendung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle oder Teile dieser Moleküle bzw. der reversen Komplemente dieser Moleküle erfolgen, z.B. mittels Hybridisierung nach Standardverfahren (siehe z.B. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd edition (2001) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. ISBN: 0879695773, Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons; 5th edition (2002), ISBN: 0471250929) oder durch Amplifikation mittels PCR.

Als Hybridisierungsprobe können z.B. Nucleinsäuremoleküle verwendet werden, die exakt die oder im Wesentlichen die unter SEQ ID NO 1 oder SEQ ID NO 3 angegebene Nucleotidsequenz oder Teile dieser Sequenzen aufweisen. Bei den als Hybridisierungsprobe verwendeten Fragmenten kann es sich auch um synthetische Fragmente oder Oligonucleotide handeln, die mit Hilfe der gängigen Synthesetechniken hergestellt wurden und deren Sequenz im wesentlichen mit der eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls übereinstimmt. Hat man Gene identifiziert und isoliert, die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuresequenzen hybridisieren, sollte eine Bestimmung der Sequenz und eine Analyse der Eigenschaften der von dieser Sequenz codierten Proteine erfolgen, um festzustellen, ob es sich um ein OK1 Protein handelt. Hierzu eignen sich insbesondere Homologievergleiche auf der Ebene der Nucleinsäure- oder Aminosäuresequenz sowie die Bestimmung der enzymatischen Aktivität. Die Aktivität eines OK1 Proteins kann z.B. wie oben oder unter Allgemeinen Methoden Punkt 11 beschrieben, erfolgen. Eine bevorzugte Bindungsaffinität zu P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke, und Autophosphorylierung eines OK1 Proteins können nach

den oben bereits und unter Allgemeine Methoden Punkte 8 und 12 beschriebenen Methoden nachgewiesen werden.

Die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisierenden Moleküle umfassen insbesondere Fragmente, Derivate und allelische Varianten der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle, die ein OK1 Protein aus Pflanzen, vorzugsweise aus Stärke speichernden Pflanzen, bevorzugt aus Pflanzenspezies der Gattung *Oryza*, insbesondere bevorzugt aus *Oryza sativa* oder *Arabidopsis thaliana* codieren. Der Begriff „Derivat“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass die Sequenzen dieser Moleküle sich von den Sequenzen der oben beschriebenen Nucleinsäuremoleküle an einer oder mehreren Positionen unterscheiden und einen hohen Grad an Identität zu diesen Sequenzen aufweisen. Die Abweichungen zu den oben beschriebenen Nucleinsäuremolekülen können dabei z.B. durch Deletion, Addition, Substitution, Insertion oder Rekombination entstanden sein.

15

Der Begriff „Identität“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Sequenzidentität über die gesamte Länge der codierenden Region von mindestens 60%, insbesondere eine Identität von mindestens 80%, vorzugsweise über 80%, besonders bevorzugt über 90% und insbesondere von mindestens 95%.

20 Unter dem Begriff „Identität“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung die Anzahl der übereinstimmenden Aminosäuren/Nucleotide (Identität) mit anderen Proteinen/Nucleinsäuren, ausgedrückt in Prozent verstanden werden. Bevorzugt wird die Identität durch Vergleiche der SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 für Aminosäuren oder SEQ. ID NO 1 oder SEQ ID NO 3 für Nucleinsäuren zu anderen
25 Proteinen/Nucleinsäuren mit Hilfe von Computerprogrammen ermittelt. Weisen Sequenzen, die miteinander verglichen werden, unterschiedliche Längen auf, ist die Identität so zu ermitteln, dass die Anzahl an Aminosäuren, welche die kürzere Sequenz mit der längeren Sequenz gemeinsam hat, den prozentualen Anteil der Identität bestimmt. Vorzugsweise wird die Identität mittels des bekannten und der
30 Öffentlichkeit zur Verfügung stehenden Computerprogramms ClustalW (Thompson et al., Nucleic Acids Research 22 (1994), 4673-4680) ermittelt. ClustalW wird öffentlich zur Verfügung gestellt von Julie Thompson (Thompson@EMBL-Heidelberg.DE) und

Toby Gibson (Gibson@EMBL-Heidelberg.DE), European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, D 69117 Heidelberg, Germany. ClustalW kann ebenfalls von verschiedenen Internetseiten, u.a. beim IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, B.P.163, 67404 Illkirch Cedex, France; 5 ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/) und beim EBI (ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/) sowie bei allen gespiegelten Internetseiten des EBI (European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, UK), heruntergeladen werden.

Vorzugsweise wird das ClustalW Computerprogramm der Version 1.8 benutzt, um 10 die Identität zwischen erfindungsgemäßen Proteinen und anderen Proteinen zu bestimmen. Dabei sind folgende Parameter einzustellen: KTUPLE=1, TOPDIAG=5, WINDOW=5, PAIRGAP=3, GAOPEN=10, GAPEXTEND=0.05, GAPDIST=8, MAXDIV=40, MATRIX=GONNET, ENDGAPS(OFF), NOPGAP, NOHGAP.

Vorzugsweise wird das ClustalW Computerprogramm der Version 1.8 benutzt, um 15 die Identität zwischen z.B. der Nucleotidsequenz der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle und der Nucleotidsequenz von anderen Nucleinsäuremolekülen zu bestimmen. Dabei sind folgende Parameter einzustellen: KTUPLE=2, TOPDIAGS=4, PAIRGAP=5, DNAMATRIX:IUB, GAOPEN=10, GAPEXT=5, MAXDIV=40, TRANSITIONS: unweighted.

20

Identität bedeutet ferner, dass funktionelle und/oder strukturelle Äquivalenz zwischen den betreffenden Nucleinsäuremolekülen oder den durch sie codierten Proteinen, besteht. Bei den Nucleinsäuremolekülen, die homolog zu den oben beschriebenen Molekülen sind und Derivate dieser Moleküle darstellen, handelt es sich in der Regel 25 um Variationen dieser Moleküle, die Modifikationen darstellen, die dieselbe biologische Funktion ausüben. Es kann sich dabei sowohl um natürlicherweise auftretende Variationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus anderen Pflanzenspezies oder um Mutationen, wobei diese Mutationen auf natürliche Weise aufgetreten sein können oder durch gezielte Mutagenese eingeführt wurden. Ferner 30 kann es sich bei den Variationen um synthetisch hergestellte Sequenzen handeln. Bei den allelischen Varianten kann es sich sowohl um natürlich auftretende Varianten

handeln, als auch um synthetisch hergestellte oder durch rekombinante DNA-Techniken erzeugte Varianten. Eine spezielle Form von Derivaten stellen z.B. Nucleinsäuremoleküle dar, die auf Grund der Degeneration des genetischen Codes von erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen abweichen.

5

Die von den verschiedenen Derivaten der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codierten Proteine weisen bestimmte gemeinsame Charakteristika auf. Dazu können z.B. biologische Aktivität, Substratspezifität, Molekulargewicht, immunologische Reaktivität, Konformation etc. gehören, sowie physikalische Eigenschaften wie z.B. das Laufverhalten in Gelelektrophoresen, chromatographisches Verhalten, Sedimentationskoeffizienten, Löslichkeit, spektroskopische Eigenschaften, Stabilität; pH-Optimum, Temperatur-Optimum etc.. Bevorzugte Eigenschaften eines OK1 Proteins wurden oben bereits im Detail erörtert und sind hier entsprechend anzuwenden.

15

Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können beliebige Nucleinsäuremoleküle sein, insbesondere DNA- oder RNA-Moleküle, beispielsweise cDNA, genomische DNA, mRNA etc. Sie können natürlich vorkommende Moleküle sein, oder durch gentechnische oder chemische Syntheseverfahren hergestellte Moleküle. Sie können einzelsträngige Moleküle sein, die entweder den codierenden oder den nicht codierenden Strang enthalten, oder doppelsträngige Moleküle.

20

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen, wobei das fremde Nucleinsäuremolekül ausgewählt ist, aus der Gruppe bestehend aus

25

a) DNA-Molekülen, die mindestens eine antisense-RNA codieren, welche eine Verringerung der Expression von mindestens einem endogenen Gen bewirkt, das ein OK1 Protein codiert;

30

b) DNA-Molekülen, die über einen Cosuppressionseffekt zu Verringerung der Expression von mindestens einem endogenen Gen führen, das ein OK1 Protein codiert;

- c) DNA-Molekülen, die mindestens ein Ribozym codieren, das spezifisch Transkripte von mindestens einem endogenen Gen spaltet, das ein OK1 Protein codiert,
- 5 d) DNA-Molekülen, die simultan mindestens eine antisense-RNA und mindestens eine sense-RNA codieren, wobei besagte antisense-RNA und besagte sense-RNA ein doppelsträngiges RNA-Molekül ausbilden, das eine Verringerung der Expression von mindestens einem endogenen Gen bewirkt, das ein OK1 Protein codiert (RNAi Technologie);
- 10 e) Mittels in vivo-Mutagenese eingeführte Nucleinsäuremoleküle, die zu einer Mutation oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in mindestens einem endogenen OK1 Protein codierenden Gen führen, wobei die Mutation oder Insertion eine Verringerung der Expression eines OK1 Protein codierenden Gens bewirkt, oder die Synthese von inaktiven OK1 Protein zur Folge hat;
- 15 f) Nucleinsäuremolekülen, die einen Antikörper codieren, wobei der Antikörper durch die Bindung an ein OK1 Protein eine Verringerung der Aktivität eines OK1 Proteins zur Folge hat,
- g) DNA Molekülen, die Transposons enthalten, wobei die Integration dieser Transposons zu einer Mutation oder einer Insertion in mindestens einem endogenen OK1 Protein codierenden Gen führt, welches eine Verringerung der Expression von mindestens einem ein OK1 Protein codierenden Gens bewirkt, oder die Synthese von inaktiven OK1 Protein zur Folge hat; und/oder
- 20 h) T-DNA Molekülen, die durch Insertion in mindestens einem endogenen OK1 Protein codierenden Gen eine Verringerung der Expression von mindestens OK1 Protein codierenden Gen bewirken, oder die Synthese von inaktivem OK1 Protein zur Folge haben.
- 25

Die Herstellung erfindungsgemäßer Pflanzenzellen und erfindungsgemäßer Pflanzen kann durch verschiedene, dem Fachmann bekannte Verfahren erzielt werden. Hierzu zählen beispielsweise die Expression einer entsprechenden antisense-RNA, oder

30 eines doppelsträngigen RNA Konstruktes, die Bereitstellung von Molekülen oder

Vektoren, die einen Cosuppressionseffekt vermitteln, die Expression eines entsprechend konstruierten Ribozyms, das spezifisch Transkripte spaltet, die ein OK1 Protein codieren, oder die so genannte "*in vivo*-Mutagenese". Ferner kann die Verringerung der OK1 Protein Aktivität in Pflanzenzellen und Pflanzen auch durch
5 die simultane Expression von sense und antisense RNA Molekülen des jeweiligen zu reprimierenden Zielgens, vorzugsweise des OK1 Gens, hervorgerufen werden.

Darüberhinaus ist bekannt, dass *in planta* die Bildung von doppelsträngigen RNA-Molekülen von Promotorsequenzen *in trans* zu einer Methylierung und einer transkriptionellen Inaktivierung homologer Kopien dieses Promotors führen kann
10 (Mette et al., EMBO J. 19, (2000), 5194-5201).

Eine weitere Möglichkeit die enzymatische Aktivität von Proteinen in Pflanzenzellen oder Pflanzen zu verringern, ist die Methode der so genannten Immunomodulation. Es ist bekannt, dass eine *in planta* Expression von Antikörpern, die ein pflanzliches Protein spezifisch erkennen, durch Ausbildung eines Protein Antikörper Komplexes
15 eine Verringerung der Aktivität betreffender Proteine in entsprechenden Pflanzenzellen zur Folge hat (Conrad und Manteufel, Trends in Plant Science 6, (2001), 399-402; De Jaeger et al., Plant Molecular Biology 43, (2000), 419-428; Jobling et al., Nature Biotechnology 21, (2003), 77-80).

Alle diese Verfahren basieren auf der Einführung eines fremden oder mehrerer
20 fremder Nukleinsäuremoleküle in das Genom von Pflanzenzellen oder Pflanzen und sind daher grundsätzlich geeignet, erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen herzustellen.

Zur Inhibierung der Genexpression mittels antisense- oder cosuppressions-
25 Technologie kann beispielsweise ein DNA-Molekül verwendet werden, das die gesamte für ein OK1 Protein codierende Sequenz einschließlich eventuell vorhandener flankierender Sequenzen umfaßt, als auch DNA-Moleküle, die nur Teile der codierenden Sequenz umfassen, wobei diese Teile lang genug sein müssen, um in den Zellen einen antisense-Effekt bzw. cosuppressions-Effekt zu bewirken.
30 Geeignet sind im allgemeinen Sequenzen bis zu einer Mindestlänge von 21 bp, vorzugsweise einer Mindestlänge von mindesten 100 bp, besonders bevorzugt von

mindestens 500 bp. Beispielsweise weisen die DNA Moleküle eine Länge von 21-100 bp, bevorzugt von 100-500 bp, besonders bevorzugt über 500 bp auf.

- Für antisense- oder cosuppressions-Ansätze geeignet ist auch die Verwendung von
- 5 DNA-Sequenzen, die einen hohen Grad an Identität zu den endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden Sequenzen haben, und die OK1 Proteine codieren. Die minimale Identität sollte größer als ca. 65 %, vorzugsweise größer als 80% sein. Die Verwendung von Sequenzen mit Identitäten von mindestens 90%, insbesondere zwischen 95% und 100% ist zu bevorzugen. Die Bedeutung des Begriffs „Identität“
- 10 wird an anderer Stelle definiert.

Ferner ist zur Erzielung eines antisense- oder eines cosuppressions-Effektes auch die Verwendung von Introns, d.h. von nicht-codierenden Bereichen von Genen, die für OK1 Proteine codieren, denkbar.

- 15 Die Verwendung von Intron-Sequenzen zur Inhibierung der Genexpression von Genen, die für Proteine der Stärkebiosynthese codieren, wurde beschrieben in den internationalen Patentanmeldungen WO97/04112, WO97/04113, WO98/37213, WO98/37214.
- 20 Dem Fachmann ist bekannt, wie er einen antisense- und einen cosuppressions-Effekt erzielen kann. Das Verfahren der cosuppressions-Inhibierung wurde beispielsweise beschrieben in Jorgensen (Trends Biotechnol. 8 (1990), 340-344), Niebel et al., (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 91-103), Flavell et al. (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 43-46), Palaqui und Vaucheret (Plant. Mol. Biol.
- 25 29 (1995), 149-159), Vaucheret et al., (Mol. Gen. Genet. 248 (1995), 311-317), de Borne et al. (Mol. Gen. Genet. 243 (1994), 613-621).

Auch die Expression von Ribozymen zur Verringerung der Aktivität von bestimmten Enzymen in Zellen ist dem Fachmann bekannt und ist beispielsweise beschrieben in

EP-B1 0321201. Die Expression von Ribozymen in pflanzlichen Zellen wurde z.B. beschrieben in Feyter et al. (Mol. Gen. Genet. 250, (1996), 329-338).

Die Verringerung der Aktivität eines OK1 Proteins in erfindungsgemäßen
5 Pflanzenzellen und erfindungsgemäßen Pflanzen kann auch durch die simultane Expression von sense und antisense RNA Molekülen (RNAi Technologie) des jeweiligen zu reprimierenden Zielgens, vorzugsweise des OK1 Protein Gens, hervorgerufen werden.

Dies kann beispielsweise durch die Verwendung von chimären Konstrukten erreicht
10 werden, die „inverted repeats“ des jeweiligen Zielgens oder Teilen des Zielgens enthalten. Hierbei codieren die chimären Konstrukte für sense und antisense RNA Moleküle des jeweiligen Zielgens. Sense und antisense RNA werden *in planta* gleichzeitig als ein RNA-Molekül synthetisiert, wobei sense und antisense RNA durch einen Spacer voneinander getrennt sein und ein doppelsträngiges RNA-Molekül
15 bilden können.

Es konnte gezeigt werden, dass die Einführung von inverted-repeat-DNA-Konstrukten in das Genom von Pflanzenzellen oder Pflanzen eine sehr effiziente Methode ist, um die zu den inverted-repeat-DNA-Konstrukten korrespondierenden Gene zu reprimieren (Waterhouse et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, (1998),
20 13959-13964; Wang and Waterhouse, Plant Mol. Biol. 43, (2000), 67-82; Singh et al., Biochemical Society Transactions Vol. 28 part 6 (2000), 925- 927; Liu et al., Biochemical Society Transactions Vol. 28 part 6 (2000), 927-929); Smith et al., (Nature 407, (2000), 319-320; internationale Patentanmeldung WO99/53050 A1). Sense und antisense Sequenzen des Zielgens bzw. der Zielgene können auch
25 getrennt voneinander mittels gleicher oder unterschiedlicher Promotoren exprimiert werden (Nap, J-P et al, 6th International Congress of Plant Molecular Biology, Quebec, 18.-24. Juni, 2000; Poster S7-27, Vortrag Session S7).

Die Verringerung der Aktivität eines OK1 Proteins in erfindungsgemäßen
30 Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen kann somit auch durch die Erzeugung doppelsträngiger RNA-Moleküle, erreicht werden. Vorzugsweise werden

hierzu „inverted repeats“ von DNA-Molekülen von OK1 Genen oder -cDNAs in das Genom von Pflanzen eingeführt, wobei die zu transkribierenden DNA-Moleküle (OK1 Gen oder -cDNA oder Fragmente dieser Gene oder cDNAs) unter Kontrolle eines Promotors stehen, der die Expression besagter DNA-Moleküle steuert.

5

Darüberhinaus ist bekannt, dass die Bildung von doppelsträngigen RNA-Molekülen von Promotor-DNA-Molekülen in Pflanzen *in trans* zu einer Methylierung und einer transkriptionellen Inaktivierung homologer Kopien dieser Promotoren führen kann, die im folgenden als Zielpromotoren bezeichnet werden sollen (Mette et al., EMBO J.

10 19, (2000), 5194-5201).

Über die Inaktivierung des Zielpromotors ist es somit möglich, die Genexpression eines bestimmten Zielgens (z.B. OK1 Gen), das natürlicherweise unter der Kontrolle dieses Zielpromotors steht, zu verringern.

D.h., die DNA-Moleküle, die die Zielpromotoren der zu reprimierenden Gene (Zielgene) umfassen, werden in diesem Fall, im Gegensatz zur ursprünglichen Funktion von Promotoren in Pflanzen, nicht als Steuerelemente zur Expression von Genen oder cDNAs, sondern selbst als transkribierbare DNA-Moleküle verwendet.

Zur Erzeugung der doppelsträngigen Zielpromotor-RNA-Moleküle *in planta*, die dort als RNA-Haarnadel-Moleküle (RNA hairpin) vorliegen können, werden vorzugsweise Konstrukte verwendet, die „inverted repeats“ der Zielpromotor-DNA-Moleküle enthalten, wobei die Zielpromotor-DNA-Moleküle unter Kontrolle eines Promotors stehen, der die Genexpression besagter Zielpromotor-DNA-Moleküle steuert. Anschließend werden diese Konstrukte in das Genom von Pflanzen eingeführt. Die Expression der „inverted repeats“ besagter Zielpromotor-DNA-Moleküle führt *in* *planta* zur Bildung doppelsträngiger Zielpromotor-RNA-Moleküle (Mette et al., EMBO J. 19, (2000), 5194-5201). Hierdurch kann der Zielpromotor inaktiviert werden.

Die Verringerung der Aktivität eines OK1 Proteins in erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und erfindungsgemäßen Pflanzen kann somit auch durch die Erzeugung doppelsträngiger RNA-Moleküle von Promotorsequenzen von OK1 Genen erreicht werden. Vorzugsweise werden hierzu „inverted repeats“ von Promotor-DNA-Molekülen von OK1 Genen in das Genom von Pflanzen eingeführt,

wobei die zu transkribierenden Zielpromotor-DNA-Moleküle (Promotor eines OK1 Gens) unter Kontrolle eines Promotors stehen, der die Expression besagter Zielpromotor-DNA-Moleküle steuert.

- 5 Zur Inhibierung der Genexpression mittels simultaner Expression von sense und antisense RNA Molekülen (RNAi Technologie) kann beispielsweise ein DNA-Molekül verwendet werden, das die gesamte für ein OK1 Protein codierende Sequenz einschließlich eventuell vorhandener flankierender Sequenzen umfaßt, als auch DNA-Moleküle, die nur Teile der codierenden Sequenz umfassen, wobei diese Teile
- 10 lang genug sein müssen, um in den Zellen einen so genannten RNAi-Effekt zu bewirken. Geeignet sind im Allgemeinen Sequenzen mit einer Mindestlänge von 40 bp, vorzugsweise einer Mindestlänge von mindesten 100 bp, besonders bevorzugt von mindestens 500 bp. Beispielsweise weisen die DNA Moleküle eine Länge von 21-100 bp, bevorzugt von 100-500 bp auf.

15

- Für simultane Expression von sense und antisense RNA Molekülen (RNAi Technologie) geeignet ist auch die Verwendung von DNA-Sequenzen, die einen hohen Grad an Identität zu den endogen in der Pflanzenzelle vorkommenden Sequenzen haben, und die Verzweigungsenzyme Klasse 3 codieren. Die minimale
- 20 Identität sollte größer als ca. 65 %, vorzugsweise größer als 80% sein. Die Verwendung von Sequenzen mit Identitäten von mindestens 90%, insbesondere zwischen 95% und 100% ist besonders zu bevorzugen. Besonders geeignet zur Inhibierung von OK1 Genen mittels RNAi Technologie sind Sequenzen, die Nucleinsäuresequenzen enthalten, welche die unter SEQ ID NO 5 angegebene
- 25 Phosphohistidindomäne codieren.

- Ferner kann die Verringerung der Aktivität eines OK1 Proteins in erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und erfindungsgemäßen Pflanzen auch durch die so genannte "in vivo-Mutagenese" erreicht werden, bei der durch Transformation von Zellen ein
- 30 hybrides RNA-DNA-Oligonucleotid ("Chimeroplast") in Pflanzenzellen eingeführt wird (Kipp, P.B. et al., Poster Session beim " 5th International Congress of Plant Molecular

- Biology, 21.-27. September 1997, Singapore; R. A. Dixon und C.J. Arntzen, Meeting report zu "Metabolic Engineering in Transgenic Plants", Keystone Symposia, Copper Mountain, CO, USA, TIBTECH 15, (1997), 441-447; internationale Patentanmeldung WO 9515972; Kren et al., Hepatology 25, (1997), 1462-1468; Cole-Strauss et al.,
5 Science 273, (1996), 1386-1389; Beetham et al., 1999, PNAS 96, 8774-8778).

Ein Teil der DNA-Komponente des RNA-DNA-Oligonucleotids ist homolog zu einer Nukleinsäuresequenz eines endogenen OK1 Gens, weist jedoch im Vergleich zur Nukleinsäuresequenz eines endogenen OK1 Gens eine Mutation auf oder enthält eine heterologe Region, die von den homologen Regionen umschlossen ist.

- 10 Durch Basenpaarung der homologen Regionen des RNA-DNA-Oligonucleotids und des endogenen Nukleinsäuremoleküls, gefolgt von homologer Rekombination, kann die in der DNA-Komponente des RNA-DNA-Oligonucleotids enthaltene Mutation oder heterologe Region in das Genom einer Pflanzenzelle übertragen werden. Dies führt zu einer Verringerung der Aktivität eines oder mehrerer OK1 Proteine.

15

Dem Fachmann ist bekannt, dass er die Aktivität von OK1 Proteinen durch die Expression von nicht-funktionellen Derivaten insbesondere trans-dominanten Mutanten solcher Proteine und/oder durch die Expression von Antagonisten/Inhibitoren solcher Proteine erreichen kann.

- 20 Antagonisten/Inhibitoren solcher Proteine umfassen beispielsweise Antikörper, Antikörperfragmente oder Moleküle mit ähnlichen Bindungseigenschaften. Beispielsweise wurde ein cytoplasmatischer scFv Antikörper eingesetzt, um die Aktivität des Phytochrom A Proteins in gentechnisch veränderten Tabakpflanzen zu modulieren (Owen, Bio/Technology 10 (1992), 790-4; Review: Franken, E, Teuschel,
25 U. und Hain, R., Current Opinion in Biotechnology 8, (1997), 411-416; Whitelam, Trends Plant Sci. 1 (1996), 268-272; Conrad und Manteufel, Trends in Plant Science 6, (2001), 399-402; De Jaeger et al., Plant Molecular Biology 43, (2000), 419-428)
Die Verringerung der Aktivität eines Verzweigungsenzyms in Kartoffelpflanzen mittels der Expression eines spezifischen Antikörpers wurde von Jobling et al. (Nature
30 Biotechnology 21, (2003), 77-80) beschrieben. Dabei wurde der Antikörper mit einer

plastidären Targetsequenz versehen, so dass die Inhibierung von in Plastiden lokalisierten Proteinen gewährleistet war.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung können erfindungsgemäße
5 Pflanzenzellen und Pflanzen auch durch die Verwendung der so genannten Insertionsmutagenese (Übersichtsartikel: Thorneycroft et al., 2001, Journal of experimental Botany 52 (361), 1593-1601) hergestellt werden. Unter Insertionsmutagenese ist insbesondere das Inserieren von Transposons oder so
10 genannter Transfer DNA (T-DNA) in ein Gen codierend für ein OK1 Protein zu verstehen, wobei dadurch die Aktivität eines OK1 Proteins in der betreffenden Zelle verringert wird.

Bei den Transposons kann es sich dabei sowohl um solche handeln, die in der Zelle natürlicherweise vorkommen (endogene Transposons), als auch um solche, die
15 natürlicherweise nicht in besagter Zelle vorkommen, sondern mittels gentechnischer Methoden, wie z.B. Transformation der Zelle, in die Zelle eingeführt wurden (heterologe Transposons). Die Veränderung der Expression von Genen mittels Transposons ist dem Fachmann bekannt. Eine Übersicht über die Nutzung von endogenen und heterologen Transposons als Werkzeuge in der
20 Pflanzenbiotechnologie ist in Ramachandran und Sundaresan (2001, Plant Physiology and Biochemistry 39, 234-252) dargestellt. Die Möglichkeit, Mutanten zu identifizieren, bei welchen spezifische Gene durch Transposoninsertionsmutagenese inaktiviert wurden, ist in einer Übersicht von Maes et al. (1999, Trends in Plant Science 4 (3), 90-96) dargestellt. Die Erzeugung von Reismutanten mit Hilfe
25 endogener Transposons ist von Hirochika (2001, Current Opinion in Plant Biology 4, 118-122) beschrieben. Die Identifizierung von Maisgenen, mit Hilfe endogener Retrotransposons wird z.B. von Hanley et al. (2000, The Plant Journal 22 (4), 557-566) dargestellt. Die Möglichkeit Mutanten mit Hilfe von Retrotransposons herzustellen und Methoden, Mutanten zu identifizieren, sind von Kumar und
30 Hirochika (2001, Trends in Plant Science 6 (3), 127-134) beschrieben. Die Aktivität von heterologen Transposons in unterschiedlichen Spezies, ist sowohl für

dikotyledone, als auch für monokotyledone Pflanzen beschrieben worden: z.B. für Reis (Greco et al., 2001, Plant Physiology 125, 1175-1177; Liu et al., 1999, Molecular and General Genetics 262, 413-420; Hiroyuki et al., 1999, The Plant Journal 19 (5), 605-613; Jeon und Gynheung, 2001, Plant Science 161, 211-219),
5 Gerste (2000, Koprek et al., The Plant Journal 24 (2), 253-263) *Arabidopsis thaliana* (Aarts et al., 1993, Nature 363, 715-717, Schmidt und Willmitzer, 1989, Molecular and General Genetics 220, 17-24; Altmann et al., 1992, Theoretical and Applied Genetics 84, 371-383; Tissier et al., 1999, The Plant Cell 11, 1841-1852), Tomate (Belzile und Yoder, 1992, The Plant Journal 2 (2), 173-179) und Kartoffel (Frey et al.,
10 1989, Molecular and General Genetics 217, 172-177; Knapp et al., 1988, Molecular and General Genetics 213, 285-290).

Grundsätzlich können die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und erfindungsgemäßen Pflanzen sowohl mit Hilfe homologer, als auch heterologer
15 Transposons hergestellt werden, wobei unter Verwendung von homologen Transposons auch solche zu verstehen sind, die bereits natürlicherweise im entsprechenden Wildtyp-Pflanzengenom vorhanden sind.

Die T-DNA Insertionsmutagenese beruht darauf, dass bestimmte Abschnitte (T-DNA)
20 von Ti-Plasmiden aus *Agrobacterium* in das Genom von pflanzlichen Zellen integrieren können. Der Ort der Integration in das pflanzliche Chromosom ist dabei nicht festgelegt, sondern kann an jeder beliebigen Stelle erfolgen. Integriert die T-DNA in einen Abschnitt des Chromosoms, der eine Genfunktion darstellt, so kann dieses zur Veränderung der Genexpression und damit auch zur Änderung der
25 Aktivität eines durch das betreffende Gen codierte Protein führen. Insbesondere führt die Integration einer T-DNA in den codierenden Bereich eines Proteins häufig dazu, dass das entsprechende Protein von der betreffenden Zelle gar nicht mehr oder nicht mehr in aktiver Form synthetisiert werden kann. Die Verwendung von T-DNA Insertionen zur Erzeugung von Mutanten ist z.B. für *Arabidopsis thaliana* (Krysan et
30 al., 1999, The Plant Cell 11, 2283-2290; Atipiroz-Leehan und Feldmann, 1997, Trends in genetics 13 (4), 152-156; Parinov und Sundaresan, 2000, Current Opinion

in Biotechnology 11, 157-161) und Reis (Jeon und An, 2001, Plant Science 161, 211-219; Jeon et al., 2000, The Plant Journal 22 (6), 561-570) beschrieben. Methoden zur Identifizierung von Mutanten, die mit Hilfe der T-DNA Insertionsmutagenese erzeugt wurden, sind u.a. beschrieben von Young et al., (2001, Plant Physiology 125, 513-518), Parinov et al. (1999, The Plant cell 11, 2263-2270), Thorneycroft et al. (2001, Journal of Experimental Botany 52, 1593-1601), und McKinney et al. (1995, The Plant Journal 8 (4), 613-622).

Die T-DNA Mutagenese ist grundsätzlich zur Erzeugung der erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen, die eine verminderte Aktivität eines OK1 Proteins aufweisen, geeignet.

T-DNA Insertions Mutanten sind z.B. für *Arabidopsis thaliana* in großer Vielzahl erzeugt worden und werden von verschiedenen Kultursammlungen („Stock centre“, z.B. Salk Institute Genomic Analysis Laboratory, 10010 N. Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, <http://signal.salk.edu/>) zur Verfügung gestellt. Die *Arabidopsis* Mutante mit der Acc. No.: SALK_110814 (Alias N610814) enthält eine T-DNA Insertion, die zu einer verringerten Aktivität eines OK1 Proteins in der Mutante führt. Bezüglich des Wachstums und der Wachstumsgeschwindigkeit verhalten sich diese Mutanten wie Wildtyp-Pflanzen, weisen aber im Gegensatz zu Wildtyp-Pflanzen einen Hoch-Stärke Phänotyp auf.

Genetisch modifizierte *Arabidopsis thaliana* Pflanzen, welche mit einem RNAi Konstrukt, enthaltend „inverted Repeats“ der codierenden Region des OK1 Proteins aus *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO 1), zeigten in der Western Blot Analyse eine deutlich reduzierte Menge an OK1 Protein. Diese Pflanzen zeigten ebenfalls einen Hoch-Stärke Phänotyp und ein normales Wachstum im Vergleich mit entsprechenden Wildtyp-Pflanzenzellen.

Daher betrifft die vorliegende Erfindung auch erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen, die einen Hoch-Stärke (starch excess) Phänotyp aufweisen.

Nachgewiesen werden können Pflanzenzellen oder Pflanzen, die einen Hoch-Stärke Phänotyp aufweisen durch Bestimmung der Menge an Stärke in einzelnen Pflanzenteilen (z.B. Blättern) mit Hilfe von dem Fachmann bekannten Methoden. So kann z.B. der Stärkegehalt mit Hilfe von enzymatisch gekoppelter photometrischer Bestimmung erfolgen.

Eine weitere einfache Methode des Nachweises eines Hoch-Stärke Phänotyps beruht auf der Färbung von Pflanzenteilen mittels Lugol'scher Lösung. Hierzu werden Pflanzenteile, bevorzugt Blätter, von Mutanten oder genetisch modifizierten Pflanzen mit Lugol'scher Lösung inkubiert. Im Vergleich dazu werden gleiche Pflanzenteile von Wildtyp-Pflanzen, die unter denselben Bedingungen aufgewachsen sind, wie die betreffenden Mutanten bzw. genetisch modifizierten Pflanzen, ebenfalls mit Lugol'scher Lösung inkubiert. Stärke färbt mit Lugol'scher Lösung bräunlich bis schwarz. Je stärker die Färbung mit Lugol'scher Lösung ist, desto mehr Stärke enthalten die betreffenden Pflanzenteile. Um einen deutlichen Unterschied zwischen den Wildtyp-Pflanzen und den Mutanten bzw. den genetisch modifizierten Pflanzen erkennen zu können, werden die betreffenden Pflanzen vor der Färbung von einzelnen Pflanzenteilen mit Lugol'scher Lösung zunächst einer Dunkelphase ausgesetzt, d.h. sie werden nicht beleuchtet.

20

Unter dem Begriff „Hoch-Stärke Phänotyp“ soll im Zusammenhang der vorliegenden Erfindung eine Mutante oder eine genetisch modifizierte Pflanze verstanden werden, die mehr Stärke in einzelnen Pflanzenteilen (z.B. Blättern) aufweisen, als entsprechende Wildtyp-Pflanzen. Bevorzugt enthalten Mutanten oder genetisch modifizierte Pflanzen am Ende einer Dunkelphase mehr Stärke in einzelnen Pflanzenteilen als entsprechende Wildtyp-Pflanzen. Die Dunkelphase kann 2 bis 20 Stunden betragen, bevorzugt beträgt sie 4 bis 16 Stunden, besonders bevorzugt 6 bis 14 und insbesondere bevorzugt 10 bis 12 Stunden.

30 Es wurde überraschenderweise gefunden, dass erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen eine modifizierte Stärke synthetisieren im Vergleich

zu Stärke von entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen.

Da bisher keine Enzyme beschrieben sind, die ausschließlich P-Stärke phosphorylieren, war es bisher auch nicht möglich, die Phosphatverteilung in von Pflanzen synthetisierter Stärke zu verändern. Durch die Bereitstellung erfindungsgemäßer Pflanzen durch die vorliegende Erfindung ist nun auch eine Veränderung des Phosphatverhältnisses in nativen Stärken möglich.

Die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und erfindungsgemäßen Pflanzen synthetisieren eine modifizierte Stärke, die in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, insbesondere dem Amylosegehalt bzw. dem Amylose/Amylopektin-Verhältnis, dem Phosphatverhältnis, dem Phosphatgehalt, dem Viskositätsverhalten, der Gelfestigkeit, der Stärkekorngröße und/oder der Stärkekornmorphologie im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. -Pflanzen synthetisierter Stärke verändert ist, so dass diese für spezielle Verwendungszwecke besser geeignet ist.

15

Daher umfasst die vorliegende Erfindung auch erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren.

Ferner sind Gegenstand der Erfindung genetisch modifizierte Pflanzen, die erfindungsgemäße Pflanzenzellen enthalten. Derartige Pflanzen können durch Regeneration aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen erzeugt werden.

Bei den erfindungsgemäßen Pflanzen kann es sich prinzipiell um Pflanzen jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln, d.h. sowohl um monokotyle als auch dikotyle Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Nutzpflanzen, d.h. Pflanzen, die vom Menschen kultiviert werden für Zwecke der Ernährung oder für technische, insbesondere industrielle Zwecke.

In einer weiteren Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Pflanze, eine Stärke speichernde Pflanze.

30

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung eine erfindungsgemäße Stärke speichernde Pflanze, die eine Mais- oder Weizenpflanze ist.

- 5 Der Begriff "Stärke speichernde Pflanzen" meint im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung alle Pflanzen mit Pflanzenteilen, die eine Speicherstärke enthalten, wie z.B. Mais, Reis, Weizen, Roggen, Hafer, Gerste, Maniok, Kartoffel, Sago, Mungbohne, Erbse, oder Sorghum.
- 10 Der Begriff „Weizenpflanze“ meint im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung Pflanzenspezies der Gattung *Triticum* oder Pflanzen, die aus Kreuzungen mit Pflanzen der Gattung *Triticum* hervorgegangen sind, besonders in der Agrarwirtschaft zu kommerziellen Zwecken angebaute Pflanzenspezies der Gattung *Triticum* bzw. Pflanzen, die aus Kreuzungen mit Pflanzen der Gattung *Triticum*
- 15 hervorgegangen sind, insbesondere bevorzugt *Triticum aestivum*.

- Der Begriff „Maispflanze“ meint im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung Pflanzenspezies der Gattung *Zea*, besonders in der Agrarwirtschaft zu kommerziellen Zwecken angebaute Pflanzenspezies der Gattung *Zea*, besonders
- 20 bevorzugt *Zea mais*.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch Vermehrungsmaterial erfindungsgemäßer Pflanzen, enthaltend eine erfindungsgemäße Pflanzenzelle.

- 25 Der Begriff „Vermehrungsmaterial“ umfasst dabei jene Bestandteile der Pflanze, die geeignet sind zur Erzeugung von Nachkommen auf vegetativem oder sexuellem Weg. Für die vegetative Vermehrung eignen sich beispielsweise Stecklinge, Calluskulturen, Rhizome oder Knollen. Anderes Vermehrungsmaterial umfasst beispielsweise Früchte, Samen, Sämlinge, Protoplasten, Zellkulturen, etc.

Vorzugsweise handelt es sich bei dem Vermehrungsmaterial um Knollen und besonders bevorzugt um endospermhaltige Körner.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erntebare Pflanzenteile erfindungsgemäßer Pflanzen, wie Früchte, Speicherwurzeln, Wurzeln, Blüten, Knospen, Sprosse oder Stämme, vorzugsweise Samen, Körner oder Knollen, wobei diese erntebaren Teile erfindungsgemäße Pflanzenzellen enthalten.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze, worin

- a) eine Pflanzenzelle genetisch modifiziert wird, wobei die genetische Modifikation zur Verringerung der Aktivität eines OK1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen führt;
- b) aus Pflanzenzellen von Schritt a) eine Pflanze regeneriert wird; und
- c) gegebenenfalls weitere Pflanzen mit Hilfe der Pflanzen nach Schritt b) erzeugt werden.

Für die laut Schritt a) in die Pflanzenzelle eingeführte genetische Modifikation gilt, dass es sich grundsätzlich um jede Art von Modifikation handeln kann, die zur Verringerung der Aktivität eines OK1 Proteins führt

Die Regeneration der Pflanzen gemäß Schritt (b) kann nach dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen (z.B. beschrieben in „Plant Cell Culture Protocols“, 1999, edt. by R.D. Hall, Humana Press, ISBN 0-89603-549-2).

Die Erzeugung weiterer Pflanzen gemäß Schritt (c) des erfindungsgemäßen Verfahrens kann z.B. erfolgen durch vegetative Vermehrung (beispielsweise über Stecklinge, Knollen oder über Calluskultur und Regeneration ganzer Pflanzen) oder durch sexuelle Vermehrung. Die sexuelle Vermehrung findet dabei vorzugsweise

kontrolliert statt, d.h. es werden ausgewählte Pflanzen mit bestimmten Eigenschaften miteinander gekreuzt und vermehrt. Die Auswahl erfolgt dabei bevorzugt in der Weise, dass die weiteren Pflanzen, die nach Schritt c) erhalten werden, die genetische Modifikation, die in Schritt a) eingeführt wurde, aufweisen.

5

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht die genetische Modifikation in der Einführung eines erfindungsgemäßen fremden Nucleinsäuremoleküls in das Genom der Pflanzenzelle, wobei das Vorhandensein oder die Expression besagten fremden Nucleinsäuremoleküls zu einer verringerten

10 Aktivität eines OK1 Proteins in der Zelle führt.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht die genetische Modifikation in der Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls wobei das fremde Nucleinsäuremolekül Aminosäuresequenzen codiert, die von einer

15 Aminosäuresequenz umfasst sind, welche ein OK1 Protein codieren.

In einer weiteren Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze zur Erzeugung von Stärke speichernden Pflanzen verwendet.

20

In einer weiteren Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Verfahren zur Erzeugung erfindungsgemäßer Mais- oder Weizenpflanzen verwendet.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht die
25 genetische Modifikation in der Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls, worin das fremde Nucleinsäuremolekül ausgewählt ist, aus der Gruppe bestehend aus

- a) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein mit der unter SEQ ID No. 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz codieren;

- b) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, dessen Aminosäuresequenz eine Identität von mindestens 60% zu der unter SEQ ID No. 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz aufweist;
- c) Nucleinsäuremolekülen, die die unter SEQ ID No. 1 oder SEQ ID NO 3 dargestellte Nucleotidsequenz oder eine komplementäre Sequenz umfassen;
- d) Nucleinsäuremolekülen, deren Nucleinsäuresequenz zu den unter a) oder c) beschriebenen Nucleinsäuresequenzen eine Identität von mindestens 60% aufweist;
- e) Nucleinsäuremolekülen, welche mit mindestens einem Strang der unter a) oder c) beschriebenen Nucleinsäuremoleküle unter stringenten Bedingungen hybridisieren;
- f) Nucleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der unter a), b), c), d), e) oder f) genannten Nucleinsäuremoleküle abweicht; und
- g) Nucleinsäuremolekülen, die Fragmente, allelische Varianten und/oder Derivate der unter a), b), c), d), e) oder f) genannten Nucleinsäuremolekülen darstellen.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht die genetische Modifikation in der Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls, worin das fremde Nucleinsäuremolekül ausgewählt ist, aus der Gruppe bestehend aus

- a) DNA-Molekülen, die mindestens eine antisense-RNA codieren, welche eine Verringerung der Expression von mindestens einem endogenen Gen bewirkt, das ein OK1 Protein codiert;
- b) DNA-Molekülen, die über einen Cosuppressionseffekt zu Verringerung der Expression von mindestens einem endogenen Gen führen, das ein OK1 Protein codiert;
- c) DNA-Molekülen, die mindestens ein Ribozym codieren, das spezifisch Transkripte von mindestens einem endogenen Gen spaltet, das ein OK1 Protein codiert,

- 5 d) DNA-Molekülen, die simultan mindestens eine antisense-RNA und mindestens eine sense-RNA codieren, wobei besagte antisense-RNA und besagte sense-RNA ein doppelsträngiges RNA-Molekül ausbilden, das eine Verringerung der Expression von mindestens einem endogenen Gen bewirkt, das ein OK1 Protein codiert (RNAi Technologie);
- 10 e) Mittels *in vivo*-Mutagenese eingeführte Nucleinsäuremoleküle, die zu einer Mutation oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in mindestens einem endogenen OK1 Protein Gen führen, wobei die Mutation oder Insertion eine Verringerung der Expression eines OK1 Protein codierenden Gens bewirkt, oder die Synthese von inaktivem OK1 Protein zur Folge hat;
- 15 f) Nucleinsäuremolekülen, die einen Antikörper codieren, wobei der Antikörper durch die Bindung an ein OK1 Protein eine Verringerung der Aktivität eines OK1 Protein zur Folge hat,
- g) DNA Molekülen, die Transposons enthalten, wobei die Integration dieser Transposons zu einer Mutation oder einer Insertion in mindestens einem endogenen OK1 Protein codierenden Gen führt, welches eine Verringerung der Expression von mindestens einem ein OK1 Protein codierenden Gens bewirkt, oder die Synthese von inaktiven OK1 Protein zur Folge hat; und/oder
- 20 h) T-DNA Molekülen, die durch Insertion in mindestens einem endogenen OK1 Protein codierenden Gen eine Verringerung der Expression von mindestens einem OK1 Protein codierenden Gen bewirken, oder die Synthese von inaktivem OK1 Protein zur Folge haben.

25 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein erfindungsgemäßes Verfahren, worin die genetisch modifizierte Pflanze eine modifizierte Stärke synthetisiert im Vergleich zu Stärke aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen.

30 In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens synthetisieren die erfindungsgemäßen Pflanzen eine modifizierte Stärke, die einen geringeren Gehalt an Stärkephosphat und/oder eine veränderte Phosphatverteilung im Vergleich zu Stärke, isoliert aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzen aufweist.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens synthetisieren die erfindungsgemäßen Pflanzen eine modifizierte Stärke, die ein verändertes Verhältnis von C-3-Phosphat zu C-6-Phosphat aufweist im Vergleich zu

5 Stärke aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen. Insbesondere bevorzugt sind dabei Stärken, welche einen verringerten Anteil von in C-3-Position gebundenem Stärkephosphat gegenüber von in C-6-Position gebundenem Stärkephosphat aufweisen im Vergleich zu Stärke aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen.

10

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die durch erfindungsgemäße Verfahren erhältlichen Pflanzen.

15

Es ist auch Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Mittel, wie z.B. DNA Moleküle zur Erzeugung von erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und erfindungsgemäßen Pflanzen, die im Vergleich zu nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen eine modifizierte Stärke synthetisieren, zur Verfügung zu stellen.

20

Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch rekombinante Nucleinsäuremoleküle enthaltend einen Promotor, der in Pflanzenzellen die Initiation der Transkription bewirkt und mindestens eine Nucleinsäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

25

- a) Nucleinsäuresequenzen, die mindestens eine antisense-RNA codieren, welche eine Verringerung der Expression von mindestens einem endogenen Gen bewirkt, das ein OK1 Protein codiert;
- b) Nucleinsäuresequenzen, die über einen Cosuppressionseffekt zu Verringerung der Expression von mindestens einem endogenen Gen führen, das ein OK1 Protein codiert;

- c) Nucleinsäuresequenzen, die mindestens ein Ribozym codieren, das spezifisch Transkripte von mindestens einem endogenen Gen spaltet, das ein OK1 Protein codiert und
- d) Nucleinsäuresequenzen, die simultan mindestens eine antisense-RNA und mindestens eine sense-RNA codieren, wobei besagte antisense-RNA und besagte sense-RNA ein doppelsträngiges RNA-Molekül ausbilden, das eine Verringerung der Expression von mindestens einem endogenen Gen bewirkt, das ein OK1 Protein codiert (RNAi Technologie).
- 10 Unter dem Begriff „rekombinantes Nukleinsäuremolekül“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Nukleinsäuremolekül verstanden werden, welches neben erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen zusätzliche Sequenzen enthält, welche natürlicherweise nicht in einer Kombination vorliegen, wie sie in erfindungsgemäßen rekombinanten Nucleinsäuren vorliegen. Die genannten
- 15 zusätzlichen Sequenzen können dabei beliebige Sequenzen sein, bevorzugt handelt es sich dabei um regulatorische Sequenzen (Promotoren, Terminationssignale, Enhancer), besonders bevorzugt um regulatorische Sequenzen, die in pflanzlichem Gewebe aktiv sind, besonders bevorzugt um regulatorische Sequenzen die in pflanzlichem Gewebe aktiv sind, in welchen Speicherstärke synthetisiert wird.
- 20 Methoden zur Erzeugung erfindungsgemäßer rekombinanter Nucleinsäuremoleküle sind dem Fachmann bekannt und umfassen gentechnische Methoden wie z.B. die Verbindung von Nucleinsäuremolekülen durch Ligation, genetische Rekombination oder die Neusynthese von Nucleinsäuremolekülen (siehe z.B. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd edition (2001) Cold Spring Harbour
- 25 Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. ISBN: 0879695773, Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons; 5th edition (2002),ISBN: 0471250929).

Regulatorische Sequenzen zur Expression in prokaryontischen Organismen

30 (Promotoren), z.B. *E. coli*, und in eukaryontischen Organismen sind ausreichend in der Literatur beschrieben, insbesondere solche zur Expression in Hefe, wie z. B.

Saccharomyces cerevisiae. Eine Übersicht verschiedener Systeme zur Expression für Proteine in verschiedenen Wirtsorganismen findet man z. B. in Methods in Enzymology 153 (1987), 383-516 und in Bitter et al. (Methods in Enzymology 153 (1987), 516-544).

5

Zur Expression von erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen, werden diese vorzugsweise mit regulatorischen DNA-Sequenzen verknüpft, die die Transkription in pflanzlichen Zellen initiieren (Promotoren). Der Promotor kann dabei so gewählt sein, dass die Expression konstitutiv erfolgt oder nur in einem bestimmten Gewebe, zu

10 einem bestimmten Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung oder zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt. Sowohl in Bezug auf die Pflanze als auch in Bezug auf das Nucleinsäuremolekül kann der Promotor homolog oder heterolog sein.

Geeignete Promotoren sind z.B. der Promotor der 35S RNA des Cauliflower Mosaic Virus und der Ubiquitin-Promotor aus Mais für eine konstitutive Expression, der

15 Patatingen-Promotor B33 (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) für eine knollenspezifische Expression in Kartoffeln oder ein Promotor, der eine Expression lediglich in photosynthetisch aktiven Geweben sicherstellt, z.B. der ST-LS1-Promotor (Stockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7943-7947; Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445-2451) oder für eine endosperm-spezifische Expression der

20 HMG-Promotor aus Weizen, der USP-Promotor, der Phaseolinpromotor, Promotoren von Zein-Genen aus Mais (Pedersen et al., Cell 29 (1982), 1015-1026; Quatroccio et al., Plant Mol. Biol. 15 (1990), 81-93), Glutelin-Promotor (Leisy et al., Plant Mol. Biol. 14 (1990), 41-50; Zheng et al., Plant J. 4 (1993), 357-366; Yoshihara et al., FEBS Lett. 383 (1996), 213-218) oder Shrunken-1 Promotor (Werr et al., EMBO J. 4 (1985),

25 1373-1380). Es können jedoch auch Promotoren verwendet werden, die nur zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt aktiviert werden (siehe beispielsweise WO 9307279). Von besonderem Interesse können hierbei Promotoren von heat-shock Proteinen sein, die eine einfache Induktion erlauben. Ferner können samenspezifische Promotoren verwendet werden, wie z.B. der USP-

30 Promoter aus *Vicia faba*, der eine samenspezifische Expression in *Vicia faba* und anderen Pflanzen gewährleistet (Fiedler et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 669-679; Bäumlein et al., Mol. Gen. Genet. 225 (1991), 459-467).

Das erfindungsgemäße rekombinante Nucleinsäuremolekül kann auch eine Terminationssequenz (Polyadenylierungssignal) enthalten, die der Addition eines Poly-A-Schwanzes an das Transkript dient. Dem Poly-A-Schwanz wird eine Funktion bei der Stabilisierung der Transkripte beigemessen. Derartige Elemente sind in der Literatur beschrieben (vgl. Gielen et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) und sind beliebig austauschbar.

Es können auch Intronsequenzen zwischen dem Promotor und der codierenden Region vorhanden sein. Solche Intronsequenzen können zur Stabilität der Expression und zu einer erhöhten Expression in Pflanzen führen (Callis et al., 1987, Genes Devel. 1, 1183-1200; Luehrsen, and Walbot, 1991, Mol. Gen. Genet. 225, 81-93; Rethmeier, et al., 1997; Plant Journal. 12(4):895-899; Rose and Beliakoff, 2000, Plant Physiol. 122 (2), 535-542; Vasil et al., 1989, Plant Physiol. 91, 1575-1579; XU et al., 2003, Science in China Series C Vol.46 No.6, 561-569). Geeignete Intronsequenzen sind beispielsweise das erste Intron des sh1-Gens aus Mais, das erste Intron des Poly-Ubiquitin Gens 1 aus Mais, das erste Intron des EPSPS Gens aus Reis oder eines der beiden ersten Introns des PAT1 Gens aus Arabidopsis.

Eine weitere Ausführungsform von erfindungsgemäßen rekombinanten Nucleinsäuremolekülen der vorliegenden Erfindung sind Vektoren, insbesondere Plasmide, Cosmide, Viren, Bacteriophagen und andere in der Gentechnik gängige Vektoren, die die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle enthalten.

25

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Wirtszelle, insbesondere eine prokaryontische oder eukaryontische Zelle, die genetisch modifiziert ist mit einem erfindungsgemäßen rekombinanten Nucleinsäuremolekül und/oder mit einem erfindungsgemäßen Vektor, sowie Zellen, die von derartigen Wirtszellen abstammen und die die erfindungsgemäße genetische Modifikation enthalten.

30

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Wirtszellen, insbesondere prokaryontische oder eukaryontische Zellen, die mit einem erfindungsgemäßen rekombinanten Nucleinsäuremolekül oder einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert wurden, sowie Wirtszellen, die von derartigen Wirtszellen abstammen und die beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle oder Vektoren enthalten.

Bevorzugt sind die erfindungsgemäßen Wirtszellen Pflanzenzellen. Dabei kann es sich prinzipiell um Pflanzenzellen aus jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln, d.h. sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Pflanzenzellen aus landwirtschaftlichen Nutzpflanzen, d.h. aus Pflanzen, die vom Menschen kultiviert werden für Zwecke der Ernährung oder für technische, insbesondere industrielle Zwecke. Vorzugsweise betrifft die Erfindung Pflanzenzellen und Pflanzen aus stärke-speichernden Pflanzen, bevorzugt Pflanzenzellen aus Pflanzen der (systematischen) Familie *Poacea*, insbesondere besonders bevorzugt sind Pflanzenzellen aus Mais- oder Weizenpflanzen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Zusammensetzungen enthaltend ein erfindungsgemäßes rekombinantes Nucleinsäuremolekül oder einen erfindungsgemäßen Vektor. Bevorzugt sind Zusammensetzungen, enthaltend ein erfindungsgemäßes rekombinantes Nucleinsäuremolekül und eine Wirtszelle. Besonders bevorzugt handelt es sich bei der Wirtszelle um eine Pflanzenzelle, insbesondere bevorzugt um eine Zelle einer Mais- oder Weizenpflanze.

25

Ein weiterer Aspekt erfindungsgemäßer Zusammensetzungen betrifft Zusammensetzungen, die zur Erzeugung von erfindungsgemäßen Wirtszellen, bevorzugt zur Erzeugung erfindungsgemäßer Pflanzenzellen verwendet werden können. Bevorzugt handelt es sich hierbei um eine Zusammensetzung, enthaltend ein erfindungsgemäßes rekombinantes Nucleinsäuremolekül oder einen erfindungsgemäßen Vektor und einen biolistischen Träger, welcher zur Einführung

30

eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls in eine Wirtszelle geeignet ist. Bevorzugte biolistische Träger sind Partikel aus Wolfram, Gold oder Kunststoffen.

Eine weitere Ausführungsform erfindungsgemäßer Zusammensetzungen betrifft
5 Zusammensetzungen enthaltend ein erfindungsgemäßes rekombinantes Nucleinsäuremolekül oder einen erfindungsgemäßen Vektor und eine Pflanzenzelle und ein synthetisches Kulturmedium. Bevorzugt enthalten solche Zusammensetzungen neben erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen, Pflanzenzellen und synthetischem Kulturmedium auch Polyethylenglykol (PEG). Bei
10 diesen Zusammensetzungen liegt das erfindungsgemäße rekombinante Nucleinsäuremolekül außerhalb der Pflanzenzelle vor, d.h. es befindet sich außerhalb des von einer Cytoplasmamembran umschlossenen Zellinneren der Pflanzenzelle.

Synthetische Kulturmedien, die zur Kultivierung und/oder zur Transformation von
15 Pflanzenzellen geeignet sind, sind dem Fachmann bekannt und z.B. ausreichend in der Literatur beschrieben. Viele unterschiedliche synthetische Kulturmedien sind auch im Fachhandel käuflich erwerbbar (z.B. DUCHEFA Biochemie B.V., Belgien).

Es wurde überraschenderweise gefunden, dass Stärke, isoliert aus
20 erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und erfindungsgemäßen Pflanzen, die eine verrinderte Aktivität eines OK1 Proteins aufweisen, eine modifizierte Stärke synthetisieren.

Insbesondere die veränderte Phosphatverteilung verleiht der Stärken veränderte funktionelle Eigenschaften, die in der Papierindustrie, der Kosmetikindustrie, der
25 Nahrungsmittelindustrie und der Pharmaindustrie von großem Interesse sind.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch modifizierte Stärken, erhältlich aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen, aus erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial oder aus erfindungsgemäßen erntebaren
30 Pflanzenteilen.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erfindungsgemäß modifizierte Stärke aus Stärke speichernden Pflanzen, bevorzugt aus Stärke speichernden Pflanzen der (systematischen) Familie Poaceae, besonders bevorzugt aus Mais- oder Weizenpflanzen.

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke, umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus einer erfindungsgemäßen Pflanzenzelle oder einer erfindungsgemäßen Pflanze, aus erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial einer solchen Pflanze und/oder aus
10 erfindungsgemäßen erntebaren Pflanzenteilen einer solchen Pflanze, vorzugsweise aus erfindungsgemäßen Stärke speichernden Teilen einer solchen Pflanze. Vorzugsweise umfasst ein solches Verfahren auch den Schritt des Erntens der kultivierten Pflanzen bzw. Pflanzenteile und/oder des Vermehrungsmaterials dieser Pflanzen vor der Extraktion der Stärke und besonders bevorzugt ferner den Schritt
15 der Kultivierung erfindungsgemäßer Pflanzen vor dem Ernten.

Verfahren zur Extraktion der Stärke aus Pflanzen oder von Stärke speichernden Teilen von Pflanzen sind dem Fachmann bekannt. Weiterhin sind Verfahren zur Extraktion der Stärke aus verschiedenen Stärke speichernde Pflanzen beschrieben,
20 z. B. in Starch: Chemistry and Technology (Hrsg.: Whistler, BeMiller und Paschall (1994), 2. Ausgabe, Academic Press Inc. London Ltd; ISBN 0-12-746270-8; siehe z. B. Kapitel XII, Seite 412-468: Mais und Sorghum Stärken: Herstellung; von Watson; Kapitel XIII, Seite 469-479: Tapioca, Arrowroot und Sago Stärken: Herstellung; von Corbishley und Miller; Kapitel XIV, Seite 479-490: Kartoffelstärke: Herstellung und
25 Verwendungen; von Mitch; Kapitel XV, Seite 491 bis 506: Weizenstärke: Herstellung, Modifizierung und Verwendungen; von Knight und Oson; und Kapitel XVI, Seite 507 bis 528: Reisstärke: Herstellung und Verwendungen; von Rohmer und Klem; Maisstärke: Eckhoff et al., Cereal Chem. 73 (1996), 54-57, die Extraktion von Maisstärke im industriellen Maßstab wird in der Regel durch das so genannte "wet
30 milling" erreicht.). Vorrichtungen, die für gewöhnlich bei Verfahren zur Extraktion von Stärke von Pflanzenmaterial verwendet werden, sind Separatoren, Dekanter, Hydrocyclone, Sprühtrockner und Wirbelschichttrockner.

Unter dem Begriff „Stärke speichernde Teile“ sollen im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung solche Teile einer Pflanze verstanden werden, in welchen Stärke, im Gegensatz zu transitorischer Blattstärke, zur Überdauerung von längeren
5 Zeiträumen als Depot gespeichert wird. Bevorzugte Stärke speichernde Pflanzenteile sind z.B. Knollen, Speicherwurzeln und Körner, besonders bevorzugt sind Körner enthaltend ein Endosperm, insbesondere bevorzugt sind Körner enthaltend ein Endosperm von Mais- oder Weizenpflanzen.

10 Modifizierte Stärke, erhältlich nach einem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung modifizierter Stärke, ist ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei
15 den erfindungsgemäßen modifizierten Stärken um native Stärken.

Der Begriff „native Stärke“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass die Stärke nach dem Fachmann bekannten Methoden aus erfindungsgemäßen Pflanzen, erfindungsgemäßigem erntebaren Pflanzenteilen,
20 erfindungsgemäßen Stärke speichernden Teilen oder erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial von Pflanzen isoliert wird.

Weiterhin ist die Verwendung erfindungsgemäßer Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßer Pflanzen zur Herstellung einer modifizierten Stärke Gegenstand
25 der vorliegenden Erfindung.

Dem Fachmann ist bekannt, dass die Eigenschaften von Stärke durch z.B. thermische, chemische, enzymatische oder mechanische Derivatisierung verändert werden können. Derivatisierte Stärken sind für verschiedene Anwendungen im
30 Nahrungsmittel- und/oder Nicht-Nahrungsmittelbereich besonders geeignet. Die

erfindungsgemäßen Stärken sind als Ausgangssubstanz besser geeignet zur Herstellung von derivatisierten Stärken als herkömmliche Stärken, dass sie durch den höheren Gehalt an Stärkephosphat einen höheren Anteil an reaktiven funktionalen Gruppen aufweisen.

5

Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch Verfahren zur Herstellung einer derivatisierten Stärke, worin erfindungsgemäße modifizierte Stärke, nachträglich derivatisiert wird.

10 Unter dem Begriff „derivatisierte Stärke“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine erfindungsgemäße modifizierte Stärke verstanden werden, deren Eigenschaften nach der Isolierung aus pflanzlichen Zellen mit Hilfe von chemischen, enzymatischen, thermischen oder mechanischen Verfahren verändert wurde.

15 In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei der erfindungsgemäßen derivatisierten Stärke um mit Hitze und/oder mit Säure behandelte Stärke.

In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um
20 Stärkeether, insbesondere um Stärke-Alkylether, O-Allylether, Hydroxylalkylether, O-Carboxylmethylether, stickstoffhaltige Stärkeether, phosphathaltige Stärkeether oder schwefelhaltige Stärkeether.

In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um
25 vernetzte Stärken.

In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um Stärke-Pfropf-Polymerisate.

In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um oxidierte Stärken.

- 5 In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um Stärkeester, insbesondere um Stärkeester, die unter Verwendung von organischen Säuren in die Stärke eingeführt wurden. Besonders bevorzugt handelt es sich um Phosphat-, Nitrat-, Sulfat-, Xanthat-, Acetat- oder Citratstärken.

- 10 Die erfindungsgemäßen derivatisierten Stärken eignen sich für verschiedene Verwendungen in der Pharmaindustrie, im Nahrungsmittel- und/oder Nicht-Nahrungsmittelbereich. Methoden zur Herstellung von erfindungsgemäßen derivatisierten Stärken sind dem Fachmann bekannt und in der allgemeinen Literatur ausreichend beschrieben. Eine Übersicht zur Herstellung von derivatisierten Stärken findet sich z.B. bei Orthoefer (in Corn, Chemistry and Technology, 1987, eds.
15 Watson und Ramstad, Chapter 16, 479-499).

Derivatisierte Stärke, erhältlich nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung einer derivatisierten Stärke ist ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

20

Ferner ist die Verwendung erfindungsgemäßer modifizierter Stärken zur Herstellung von derivatisierter Stärke Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

25 **Beschreibung der Sequenzen**

SEQ ID NO 1: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region des A.t.-OK1 Proteins aus *Arabidopsis thaliana*. Diese Sequenz ist den Vektoren OK1-pGEM und OK1-pDEST™17 und inseriert.

SEQ ID NO 2: Aminosäuresequenz codierend das A.t.-OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana*. Diese Sequenz ist von der unter SEQ ID NO 1 dargestellten Nucleinsäuresequenz ableitbar.

5 SEQ ID NO 3: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region des O.s.-OK1 Proteins aus *Oryza sativa*. Diese Sequenz ist dem Vektor pMI50 inseriert.

SEQ ID NO 4: Aminosäuresequenz codierend das O.s.-OK1 Protein aus *Oryza sativa*. Diese Sequenz ist von der unter SEQ ID NO 3 dargestellten Nucleinsäuresequenz ableitbar.

10 SEQ ID NO 5: Peptidsequenz codierend die Phosphohistidindomäne der OK1 Proteine aus *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa*.

SEQ ID NO 6: Peptidsequenz enthaltend in der Aminosäuresequenz codierend ein S.t.-OK1 Protein aus Kartoffel.

SEQ ID NO 7: Peptidsequenz enthaltend in der Aminosäuresequenz codierend ein S.t.-OK1 Protein aus Kartoffel.

15 SEQ ID NO 8: Peptidsequenz enthaltend in der Aminosäuresequenz codierend ein S.t.-OK1 Protein aus Kartoffel.

SEQ ID NO 9: Peptidsequenz enthaltend in der Aminosäuresequenz codierend ein S.t.-OK1 Protein aus Kartoffel.

20 SEQ ID NO 10: Partielle Nucleinsäuresequenz codierend ein S.t.-OK1 Protein aus Kartoffel. Diese Nucleinsäuresequenz wurde mittels der unter SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13 und SEQ ID NO 14 dargestellten Peptidsequenzen mittels „Blast Search“ in der TIGR Datenbank identifiziert.

25 SEQ ID NO 11: Partielle Aminosäuresequenz codierend ein S.t.-OK1 Protein aus Kartoffel. Die dargestellte Aminosäuresequenz ist von der unter SEQ ID NO 15 dargestellten Nucleinsäuresequenz ableitbar.

Beschreibung der Abbildungen

Fig. 1: Denaturierendes Acrylamidgel zur Identifizierung von Proteinen aus *Arabidopsis thaliana*, die bevorzugt an nicht-phosphorylierte-Stärke im Vergleich zu phosphorylierter-Stärke binden. In Spur „M“ ist ein Standard Protein Molekulargewichtsmarker aufgetragen. In Spur „-“ sind Proteine, erhalten nach Inkubation des Kontrollansatzes C aus Beispiel 1 d) aufgetragen. In Spur „K“ sind Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Inkubation mit nicht-phosphorylierter-Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante (Ansatz B, Beispiel 1 d)), aufgetragen. In Spur „P“ sind Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Inkubation mit Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante, die nachträglich *in vitro* mit einem R1 Protein phosphoryliert wurde (Ansatz A, Beispiel 1 d)) aufgetragen. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Acrylamidgel mit Comassie Blau gefärbt.

Fig. 2: Nachweis der Autophosphorylierung des OK1 Proteins. Fig. 2 A) stellt ein nach erfolgter Elektrophorese mit Comassie Blau gefärbtes denaturierendes (SDS) Acrylamidgel dar. Fig. 2 B) zeigt die Autoradiographie eines denaturierenden (SDS) Acrylamidgels. Auf beide Gele wurden jeweils die gleichen Proben zu gleichen Mengen aufgetragen. M: Standard Protein Molekulargewichtsmarker; R1: Probe aus Reaktionsgefäß 1 nach Beispiel 7 (nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP); R2: Probe aus Reaktionsgefäß 2 nach Beispiel 7 (nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP wurde das Protein auf 95°C erhitzt); R3: Probe aus Reaktionsgefäß 3 nach Beispiel 7 (nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP wurde das Protein in 0,5 M HCl inkubiert); R4: Probe aus Reaktionsgefäß 4 nach Beispiel 7 (nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP wurde das Protein mit 0,5 M NaOH inkubiert).

Fig. 3: Nachweis der Stärke phosphorylierenden Aktivität eines OK1 Proteins (siehe Beispiel 6). OK1 Protein wurde mit nicht-phosphorylierter-Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante (Ansatz A) und Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante, die nachträglich *in vitro* mit einem R1 Protein phosphoryliert wurde (Ansatz B) inkubiert. Ansatz C entspricht

Ansatz B, außer dass dieser Ansatz C ohne OK1 Protein inkubiert wurde. Für jeden Ansatz (A, B, C) wurden je zwei unabhängige Versuche durchgeführt (Versuch 1 und Versuch 2). Graphisch dargestellt sind die jeweiligen Mengen, gemessen in cpm (Counts per minute), an ^{33}P markiertem Phosphat, welches von dem OK1 Protein in nicht-phosphorylierte-Stärke (Ansatz A) und phosphorylierte Stärke (Ansatz B) eingeführt wurde.

Fig. 4: Vergleich der C-Atom-Positionen von Glucosemolekülen der Stärke, die von einem R1 Protein bzw. einem OK1 Protein phosphoryliert werden (siehe Beispiel 9). OK1 Protein (Ansatz A) wurde in Anwesenheit von mit ^{33}P markierten ATP mit Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante, die nachträglich *in vitro* mit einem R1 Protein phosphoryliert wurde, inkubiert. R1 Protein (Ansatz B) wurde in Anwesenheit von mit ^{33}P markierten ATP mit Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde eine Totalhydrolyse der Stärke durchgeführt und die erhaltenen Hydrolyseprodukte mittels HPAE Chromatographie aufgetrennt. Als Standard wurden den Hydrolyseprodukten vor der Auftrennung Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat zugegeben. Die mittels HPAE Chromatographie aufgetrennten Hydrolyseprodukte wurden in einzelnen Fraktionen aufgesammelt. Mit Fraktion 15 eluierte das zugegebene Glucose-6-Phosphat und mit Fraktion 17 das zugegebene Glucose-3-Phosphat. Die erhaltenen Fraktionen wurden anschließend auf das Vorliegen von radioaktiv markiertem Phosphat hin untersucht. Die in den einzelnen Fraktionen gemessene Menge an ^{33}P markiertem Phosphat, gemessen in cpm (Counts per minute), welches von dem OK1 Protein oder dem R1 Protein jeweils in die Hydrolyseprodukte der phosphorylierten-Stärke eingeführt wurde, ist graphisch dargestellt.

Fig. 5 Nachweis der Autophosphorylierung des OK1 Proteins. Fig. 5 A) stellt einen Western Blot dar. Fig. 5 B) zeigt die Autoradiographie eines denaturierenden (SDS) Acrylamidgels. Auf beide Gele wurden jeweils die gleichen Proben zu gleichen Mengen aufgetragen. Das OK1 Protein wurde entweder mit randomisiertem

radioaktiv markiertem ATP oder mit spezifisch in gamma-Position radioaktiv markiertem ATP inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Proteine entweder auf 30°C oder 95°C erhitzt, oder in 0,5 M NaOH bzw. 0,5 M HCl inkubiert.

- 5 Fig. 6 Nachweis der Übertragung des beta-Phosphatrestes von ATP auf Stärke in einer von einem OK1 Protein katalysierten Reaktion. Es wurde zur Phosphorylierung von mittels eines R1 Proteins *in vitro* phosphorylierter Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante, durch ein OK1 Protein entweder spezifisch in gamma-Position mit ^{33}P markiertes ATP oder randomisiertes ^{33}P ATP
10 eingesetzt. In den jeweiligen mit „control“ bezeichneten Experimenten wurde kein OK1 Protein zugegeben. Jeder Versuchsansatz wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Ergebnisse beider Versuche sind dargestellt.

15

Allgemeine Methoden

- Im Folgenden werden Methoden beschrieben, welche zur Durchführung der erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können. Diese Methoden stellen
20 konkrete Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung dar, beschränken die vorliegende Erfindung jedoch nicht auf diese Methoden. Dem Fachmann ist bekannt, dass er durch Modifikation der beschriebenen Methoden und/oder durch Ersetzen einzelner Methodenteile durch alternative Methodenteile die Erfindung in gleicher Weise ausführen kann.

25

1. Herstellung von Proteinextrakten aus pflanzlichen Gewebe

- a) Herstellung von Proteinextrakten aus pflanzlichen Geweben

Blattmaterial wird sofort nach der Ernte in flüssigem Stickstoff eingefroren und daraufhin im Mörser unter flüssigem Stickstoff homogenisiert. Das zerkleinerte Blattmaterial wird mit dem ca. 3,5-fachen Volumen (bezogen auf das Gewicht des eingesetzten Blattmaterials) kaltem (4°C) Bindungspuffer versetzt und für 2x 10 s mit einem Ultraturrax (maximale Geschwindigkeit) aufgeschlossen. Nach der ersten Behandlung mit einem Ultraturrax wird das zerkleinerte Blattmaterial auf Eis abgekühlt, bevor die zweite Behandlung erfolgt. Anschließend wird das behandelte Blattmaterial durch ein 100 µm Nylonnetz gegeben und 20 min zentrifugiert (50 ml Zentrifugengefäß, 20.000xg, 4°C).

10

b) Ausfällen der in den Proteinextrakten enthaltenen Proteine

Der nach Zentrifugation nach Schritt a) erhaltene Überstand wird abgenommen und sein Volumen bestimmt. Für das Ausfällen von Proteinen wird Ammoniumsulfat über einen Zeitraum von 30 Minuten kontinuierlich unter Rühren auf Eis bis zu einer Endkonzentration von 75% (Gewicht/Volumen) dem Überstand zugegeben. Anschließend wird der Überstand für eine weitere Stunde auf Eis unter Rühren inkubiert. Die aus dem Überstand ausgefällten Proteine werden bei 20.000xg und 4°C für 10 min pelletiert und das Pellet anschließend in 5 ml Bindungspuffer aufgenommen, d.h. die im Pellet vorliegenden Proteine werden in Lösung gebracht.

20

c) Entsalzen der ausgefällten Proteine

Die gelösten Proteine werden mittels einer mit Sephadex G25 gefüllten PD10-Säule (Amersham Bioscience, Freiburg, Prod. Nr. Säulen: 17-0851-01, Prod. Nr. Sephadex G25-M: 17-0033-01) bei einer Temperatur von 4°C entsalzt, d.h. auch das zur Ausfällung unter Schritt b) verwendete Ammoniumsulfat wird von den gelösten Proteinen abgetrennt. Die PD10-Säule wird vor dem Auftragen der nach Schritt b) in Lösung gebrachten Proteine mit Bindungspuffer äquilibriert. Dazu werden fünfmal jeweils 5 ml Bindungspuffer über die Säule gegeben. Anschließend werden pro Säule 2,5 ml der nach Schritt b) erhaltenen Proteinlösung auf die Säule gegeben, bevor Proteine mit 3,5 ml Bindungspuffer von der Säule eluiert werden.

30

d) Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wird mit einem Bradford-Essay (Biorad, München, Prod. Nr. 500-0006 bestimmt (Bradford, 1976, Anal. Biochem. 72, 248-254).

5 e) Zusammensetzung des Bindungspuffers [

Bindungspuffer:	50 mM	HEPES/NaOH (od. KOH), pH 7.2
	1 mM	EDTA
	2 mM	Dithioerythritol (DTE)
	2 mM	Benzamidin
10	2 mM	ϵ -Aminocaprinsäure
	0.5 mM	PMSF
	0.02 %	Triton X-100

2. Isolierung von Blattstärke

a) Isolierung von Stärkegranula aus pflanzlichen Geweben

- 15 Blattmaterial wird sofort nach der Ernte in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Blattmaterial wird im Mörser portionsweise unter flüssigem Stickstoff homogenisiert und in insgesamt dem ca. 2,5-fachen Volumen (Gewicht/Volumen) Stärkepuffer aufgenommen. Diese Suspension wird zusätzlich noch einmal im Waring Blendor für 20 s bei maximaler Geschwindigkeit homogenisiert. Das Homogenisat wird durch ein
- 20 Nylonnetz (100 μ m Maschenweite) gegeben und 5 Minuten bei 1.000xg zentrifugiert. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wird verworfen.

b) Reinigung der Stärke, isoliert aus pflanzlichen Geweben

- Das nach Schritt a) erhaltene Stärke enthaltende Pellet wird nach Entfernen des auf
- 25 der Stärke oben aufliegenden grünen Materials durch abspülen des grünen Materials mit Stärkepuffer in Stärkepuffer aufgenommen und sukzessive durch Nylonnetze unterschiedlicher Maschenweite (in der Reihenfolge 60 μ m, 30 μ m, 20 μ m) gegeben.

Das Filtrat wird über ein 10 ml Percoll-Kissen (95% (v/v) Percoll (Pharmacia, Uppsala, Schweden), 5% (v/v) 0,5M HEPES-KOH pH7,2) zentrifugiert (Correx-Röhrchen, 15 min, 2.000xg) zentrifugiert. Das nach dieser Zentrifugation erhaltene Sediment wird einmal in Stärkepuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (5 min, 1.000xg,).

c) Entfernen der an die Stärke gebundenen Proteine

Nach Schritt b) werden Stärkegranula erhalten, welche an Stärke bindende Proteine enthalten. Die an die Oberfläche der Stärkegranula gebundenen Proteine werden durch viermalige Inkubation mit 0,5 % SDS (Natriumlaurylsulfat) für jeweils 10-15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln entfernt. Nach jedem Waschschrift erfolgt dabei eine Zentrifugation (5 min, 5.000xg), um die Stärkegranula vom betreffenden Waschpuffer abzutrennen.

d) Reinigung von Proteinen befreiter Stärke

Die nach Schritt c) erhaltene, von an ihre Oberfläche bindenden Proteinen befreite Stärke, wird anschließend durch viermaliges Inkubieren mit Waschpuffer für jeweils 10-15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln entfernt. Nach jedem Waschschrift erfolgt dabei eine Zentrifugation (5 min, 1.000xg), um die Stärkegranula vom betreffenden Waschpuffer abzutrennen. Diese Reinigungsschritte dienen vor allem der Entfernung des bei Inkubationen nach Schritt c) eingesetzten SDS.

e) Bestimmung der Konzentration von isolierter Stärke

Die Menge der Stärke, isoliert nach Schritt d) wird photometrisch bestimmt. Die optische Dichte der Stärkesuspension wird nach geeigneter Verdünnung gegen eine Eichgerade bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Der lineare Bereich der Eichgerade befindet sich zwischen 0 und 0,3 Extinktionseinheiten.

Zur Erstellung der Eichgeraden wird Stärke, z.B. isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante unter Vakuum getrocknet, gewogen und in einem definierten Volumen Wasser aufgenommen. Die so erhaltene Suspension wird

in mehreren Schritten jeweils im Verhältnis 1 zu 1 mit Wasser verdünnt, bis man eine Suspension von ca. 5 µg Stärke pro ml Wasser enthält. Die durch die einzelnen Verdünnungsschritte erhaltenen Suspensionen werden im Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm vermessen. Die für die jeweiligen Suspensionen erhaltenen Absorptionswerte werden gegen die in der jeweiligen Suspension vorliegende Konzentration der Stärke aufgetragen. Die erhaltene Eichgerade sollte in dem Bereich von 0 µg Stärke pro ml Wasser bis 0,3 µg Stärke pro ml Wasser einer linearen mathematischen Funktion folgen.

10 f) Aufbewahrung isolierter Stärke

Die Stärke kann entweder direkt, ohne weitere Lagerung für weitere Versuche verwendet werden, oder in Aliquots in 1,5 mL Eppendorfgefäßen bei -20°C gelagert werden. Sowohl die eingefrorene Stärke, als auch nicht gelagerte, frisch isolierte Stärke kann gegebenenfalls z.B. für die in der vorliegenden Erfindung beschriebenen Methoden betreffend *in vitro*-Phosphorylierung und/oder Bindungstest eingesetzt werden.

g) Zusammensetzung von verwendeten Puffern

1x Stärkepuffer: 20 mM HEPES-KOH, pH 8.0
0.2 mM EDTA
0.5 % Triton X-100

Waschpuffer: 50 mM HEPES/KOH, pH 7,2

25 3. **Rekombinante Expression eines identifizierten Stärke phosphorylierenden Proteins**

a) Herstellung eines bakteriellen Expressionsvektors enthaltend eine cDNA, die ein Stärke phosphorylierendes Protein codiert

Die cDNA codierend ein Stärke phosphorylierendes Protein kann z.B. unter Verwendung von mRNA oder poly-A-plus-mRNA aus pflanzlichen Geweben als „Template“ mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert werden. Dazu wird zunächst eine reverse-Transkriptase für die Herstellung eines zur einem Stärke phosphorylierenden Protein codierenden mRNA komplementären cDNA Stranges verwendet, bevor der betreffende cDNA Strang mittels DNA-Polymerase amplifiziert wird. So genannte „Kits“ enthaltend Substanzen, Enzyme und Anleitungen zur Durchführung von PCR Reaktionen sind käuflich erwerbbar (z.B. SuperScript™ One-Step RT-PCR System, Invitrogen, Prod. Nr.: 10928-034. Die amplifizierte cDNA codierend ein Stärke phosphorylierendes Protein kann anschließend in einen bakteriellen Expressionsvektor, z.B. pDEST™17 (Invitrogen) kloniert werden. pDEST™17 enthält den T7 Promotor, der zur Initiation der Transkription von der T7-RNA-Polymerase verwendet wird. Weiterhin enthält der Expressionsvektor pDEST™17 in 5'-Richtung vom T7 Promotor eine Shine Dalgarno Sequenz gefolgt von einem Start-Codon (ATG) und von einem so genannten His-tag. Dieser His-tag besteht aus sechs direkt hintereinander folgenden Codons, die jeweils die Aminosäure Histidin codieren und befindet sich in dem Leseramen des genannten Start Codons. Die Klonierung einer cDNA, codierend ein Stärke phosphorylierendes Protein in pDEST™17 erfolgt in der Weise, dass eine translationale Fusion zwischen den Codons für das Start Codon, den His-tag und der cDNA codierend ein Stärke phosphorylierendes Protein entsteht. Dadurch wird nach Transkription, initiiert am T7 Promotor und anschließender Translation ein Stärke phosphorylierendes Protein erhalten, welches an seinem N-Terminus zusätzliche Aminosäuren, beinhaltend den His-tag, enthält.

Es sind jedoch auch andere zur Expression in Mikroorganismen geeignete Vektoren zur Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins verwendbar. Expressionsvektoren und dazugehörige Expressionsstämme sind dem Fachmann bekannt und in geeigneter Kombination auch käuflich beim entsprechenden Fachhandel erwerbbar.

30

b) Herstellung von Expressionsklonen in *Escherichia coli*

Es wird zunächst ein entsprechender Transformations kompetenter *E. coli* Stamm, der eine T7-RNA-Polymerase chromosomal codiert mit dem nach Schritt a) hergestellten Expressionsplasmid transformiert und anschließend auf durch Agar verfestigtem Nährmedium über Nacht bei 30°C inkubiert. Als Expressionstamm eignen sich z.B. BL21 Stämme (Invitrogen Prod. Nr.: C6010-03 die eine T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle eines mittels IPTG induzierbarem Promotor (lacZ) chromosomal codieren.

Aus der Transformation hervorgehende Bakterienkolonien können mit dem Fachmann bekannten Methoden daraufhin untersucht werden, ob sie das gewünschte Expressionsplasmid, enthaltend eine das Stärke phosphorylierende Protein codierende cDNA, enthalten. Es werden dabei Expressionsklone erhalten.

c) Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins in *Escherichia coli*

Zunächst wird eine Vorkultur hergestellt. Dazu wird ein Expressionsklon erhalten nach Schritt b) in 30 ml Terrific Broth (TB-Medium), enthaltend ein Antibiotikum zur Selektion auf Anwesenheit des Expressionsplasmides beimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert.

Anschließend wird eine Hauptkultur zur Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins hergestellt. Dazu werden jeweils 1 Liter Erlenmeyer-Kolben, enthaltend jeweils 300 ml auf 30°C vorgewärmtes TB-Medium und ein Antibiotikum zur Selektion auf Anwesenheit des Expressionsplasmides mit jeweils 10 ml einer entsprechenden Vorkultur beimpft und bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) bis zu einer Optischen Dichte (gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm; OD₆₀₀) von ca. 0,8 inkubiert.

Wurde zur Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins ein Expressionsplasmid verwendet, bei welchem die Expression des Stärke phosphorylierenden Proteins mittels eines induzierbaren Systems initiiert wird (z.B. der Expressionsvektor pDEST™17 in BL21 *E. coli* Stämmen, induzierbar mittels IPTG), so wird nach Erreichen einer OD₆₀₀ von ca. 0,8 der in Hauptkultur der betreffende Induktor (z.B. IPTG) zugegeben. Nach Zugabe des Induktors wird die Hauptkultur bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von ca. 1,8

erreicht ist. Anschließend wird die Hauptkultur für 30 Minuten auf Eis gekühlt, bevor die Zellen der Hauptkultur durch Zentrifugation (10 Minuten bei 4.000xg und 4°C) vom Kulturmedium abgetrennt werden.

5 4. Reinigung eines Stärke phosphorylierenden Proteins

a) Aufschluss von ein Stärke phosphorylierendes Protein exprimierenden Zellen

Die nach Zentrifugation in Schritt c), Punkt 3 Allgemeine Methoden erhaltenen Zellen werden in Lysispuffer resuspendiert. Dabei werden ca. 4 ml Lysispuffer zu etwa 1 g Zellen gegeben. Anschließend werden die resuspendierten Zellen für 30 Minuten auf
10 Eis inkubiert, bevor sie mit Hilfe einer Ultraschallsonde (Baudelin Sonoplus UW 2070, Baudelin electronic, Berlin, Einstellungen: Cycle 6, 70%, 1 Minute) unter ständiger Kühlung durch Eis aufgeschlossen werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die Zellsuspension während der Ultraschallbehandlung nicht zu stark erwärmt wird. Die nach der Ultraschallbehandlung erhaltene Suspension wird Zentrifugiert (12
15 Minuten bei 20.000xg, 4°C) und der nach Zentrifugation erhaltene Überstand wird durch einen Filter mit 45 µm Porengröße filtriert.

b) Reinigung des Stärke phosphorylierenden Proteins

Handelt es sich bei dem in *E. coli* Zellen exprimierten Stärke phosphorylierenden
20 Protein um ein Fusionsprotein mit einem His-tag, so kann eine Aufreinigung mit Hilfe von Nickelionen erfolgen, an welches das His-tag mit hoher Affinität bindet. Dazu werden 25 ml des in Schritt d) erhaltenen Filtrates wird mit 1 ml Ni-Agarose-Slurry (Qiagen, Prod. Nr.: 30210) versetzt und für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wird das Gemisch aus Ni-Agarose-Slurry und Filtrat über eine Polystyren Säule
25 (Pierce, Prod. Nr.: 29920) gegeben. Der Säulendurchlauf wird verworfen. Die Säule wird zunächst durch Aufgeben von 8 ml Lysispuffer gewaschen, wobei der Durchlauf erneut verworfen wird. Die Elution des Stärke phosphorylierenden Proteins erfolgt dann durch fraktioniertes Aufgeben von zweimal jeweils 1 ml E1-Puffer, gefolgt von einmal 1 ml E2-Puffer und anschließend von fünfmal jeweils 1 ml E3-Puffer auf die
30 Säule. Der Durchlauf, der bei dem Aufgeben der einzelnen Fraktion der

entsprechenden Elutionspuffer (E1-, E2-, E3-Puffer) auf die Säule anfällt, wird in voneinander getrennten Fraktionen aufgefangen. Aliquots dieser Fraktionen werden anschließend mittels denaturierender SDS-Acrylamidgelelektrophorese, gefolgt von einer Comassie-Blau Färbung analysiert. Die Fraktionen, welche das Stärke phosphorylierende Protein in ausreichender Menge und zufriedenstellender Reinheit enthalten, werden vereinigt und mit Hilfe von Druckfiltration bei 4°C aufkonzentriert. Die Druckfiltration kann z.B. mit Hilfe einer Amicon-Zelle (Amicon Ultrafiltration Cell, Model 8010, Prod. Nr.: 5121) bei Verwendung einer Diaflo PM30-Membran (Millipore, Prod. Nr.: 13212) bei 4°C erfolgen. Zur Konzentrierung können aber auch andere dem Fachmann bekannte Methoden verwendet werden.

c) Zusammensetzung verwendeter Puffer

Lysispuffer: 50 mM HEPES
300 mM NaCl
10 mM Imidazol
pH 8,0 (einstellen mit NaOH)
1 mg/ml Lysozym (direkt vor Verwendung des Puffers zugeben)
¼ Tablette pro 10 ml Proteaseinhibitoren Complete EDTA free, (Roche Produkt Nr.: 1873580) (direkt vor Verwendung des Puffers zugeben)

20

Elutionspuffer E1: 50 mM HEPES
300 mM NaCl
50 mM Imidazol
pH 8,0 (einstellen mit NaOH)

25

Elutionspuffer E2: 50 mM HEPES
300 mM NaCl
75 mM Imidazol

pH 8,0 (einstellen mit NaOH)

Elutionspuffer E3: 50 mM HEPES

300 mM NaCl

5 250 mM Imidazol

pH 8,0 (einstellen mit NaOH)

5. Rekombinante Expression eines R1 Proteins

Die Rekombinante Expression eines R1 Proteins ist in der Literatur beschrieben
10 (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171; Mikkelsen et al., 2004, Biochemical Journal
377, 525-532), kann jedoch auch entsprechend der weiter oben unter Punkt 3.
Allgemeine Methoden beschriebenen Methode betreffend die Rekombinante
Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins durchgeführt werden.

15 6. Reinigung eines R1 Proteins

Die Aufreinigung eines R1 Proteins ist in der Literatur beschrieben (Ritte et al., 2002,
PNAS 99, 7166-7171; Mikkelsen et al., 2004, Biochemical Journal 377, 525-532),
kann jedoch auch entsprechend der weiter oben unter Punkt 4. Allgemeine
Methoden beschriebenen Methode betreffend die Reinigung eines Stärke
20 phosphorylierenden Proteins durchgeführt werden, wenn durch Expression von R1 in
E. coli Zellen ein R1 Fusionsprotein entsteht, welches einen His-tag enthält.

7. In vitro Herstellung von phosphorylierter-Stärke ausgehend von nicht-phosphorylierter-Stärke

25 a) In vitro Phosphorylierung von nicht-phosphorylierter-Stärke

Stärke, welche kein Stärkephosphat enthält (z.B. isoliert aus Blättern von *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutanten mit Hilfe der oben unter Punkt 2, Allgemeine Methoden

- beschriebenen Methode) wird mit R1 Puffer und mit gereinigtem R1 Protein (ca. 0,25 µg R1 Protein pro mg Stärke) versetzt, so dass sich ein Stärkegehalt von 25 mg pro ml ergibt. Dieser Reaktionsansatz wird über Nacht (ca. 15 h) bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. An die im Reaktionsansatz vorliegende Stärke gebundenes R1 wird nach Abschluss der Reaktion durch vier maliges Waschen mit jeweils ca. 800 µl 0,5 % SDS entfernt. Anschließend wird das noch in der *in vitro* phosphorylierten Stärke vorliegende SDS durch fünf maliges Waschen mit jeweils 1 ml Waschpuffer entfernt. Alle Waschschriffe finden jeweils bei Raumtemperatur für 10 bis 15 Minuten unter Schütteln statt. Nach jedem Waschschriff erfolgt eine Zentrifugation (2 min, 10.000xg), um die Stärkegranula vom betreffenden SDS-Puffer oder Waschpuffer abzutrennen.

b) Zusammensetzung verwendeter Puffer

15	R1-Puffer:	50 mM	HEPES/KOH,	pH	7,5
		1 mM	EDTA		
		6 mM	MgCl ₂		
		0,5 mM	ATP		

Waschpuffer: 50 mM HEPES/KOH, pH 7,2

20

8. Bindung von Proteinen an phosphorylierte-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke

a) Isolierung von P-Stärke-Protein-Komplexen bzw. nicht-phosphorylierter-Stärke-Protein-Komplexen

- 25 Ca. 50 mg P-Stärke, bzw. ca. 50 mg nicht-phosphorylierte Stärke werden in getrennten Ansätzen jeweils in ca. 800 µl Proteinextrakt resuspendiert. Die Proteinkonzentration der Proteinextrakte sollte jeweils ca. 4 mg bis 5 mg pro ml betragen. Die Inkubation der P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierten-Stärke mit Proteinextrakten wird bei Raumtemperatur für 15 Minuten unter Schütteln bei 4°C

durchgeführt. Nach erfolgter Inkubation werden die Reaktionsansätze über ein Percoll-Kissen (4 ml) abzentrifugiert (15 Minuten, 3500 rpm, 4°C). Nicht an phosphorylierte Stärke bzw. P-Stärke gebundene Proteine befinden sich nach Zentrifugation im Überstand und können mit einer Pasteurpipette abgenommen
5 werde. Der Überstand wird verworfen. Das nach Zentrifugation erhaltene sedimentierte Pellet enthaltend P-Stärke und nicht-phosphorylierte-Stärke inclusive der an die betreffenden Stärken jeweils gebundene Proteine (P-Stärke-Protein-Komplexe bzw. nicht-phosphorylierter-Stärke-Protein-Komplexe), wird zweimal mit je 1 ml Waschpuffer (siehe oben, Allgemeine Methoden unter Punkt 7.b)), durch
10 Inkubation für jeweils 3 Minuten bei 4°C unter Schütteln gewaschen. Nach jedem Waschschrift erfolgt eine Zentrifugation (5 Minuten, 8000 rpm, 4°C in einer Tischzentrifuge, Hettich EBA 12R), um die P-Stärke, bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke von dem Waschpuffer abzutrennen.

15 b) In Lösung bringen der in den P-Stärke-Protein-Komplexen bzw. nicht-phosphorylierter-Stärke-Protein-Komplexen gebundenen Proteinen

Die nach Schritt a) erhaltenen P-Stärke-Protein-Komplexe bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke-Protein-Komplexe werden jeweils in ca. 150 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert und 15 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur
20 inkubiert. Anschließend wird die P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke von den in Lösung gebrachten Proteinen durch Zentrifugation (1 Minute, 13.000 rpm, Raumtemperatur, Eppendorf Tischzentrifuge) abgetrennt. Der nach Zentrifugation erhaltene Überstand wird zur Entfernung jeglicher Reste von P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke noch einmal zentrifugiert (1 Minute, 13.000 rpm,
25 Raumtemperatur, Eppendorf Tischzentrifuge) und abgenommen. Es werden dadurch in Lösung gebrachte Proteine, die an P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke binden, erhalten.

c) Zusammensetzung verwendeter Puffer

30 SDS-Probenpuffer: 187,5 mM Tris/HCl pH 6,8

6 % SDS

30 % Glycerin
~ 0,015 % Bromphenolblau
60 mM Dithioerythritol (DTE, frisch zusetzen!)

- 5 Percoll: Percoll wird über Nacht gegen eine Lösung, bestehend aus und 25 mM HEPES / KOH, pH 7,0 dialysiert

9. Auftrennung von Proteinen, die an P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke binden

- 10 Die nach Schritt c) unter Punkt 8. Allgemeine Methoden betreffend die Bindung von Proteinen an P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke erhaltenen in Lösung gebrachten Proteine werden jeweils für 5 Minuten bei 95°C inkubiert und anschließend mit Hilfe denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Dabei wird für die durch Bindung an P-Stärke und für die durch Bindung an nicht-
- 15 phosphorylierte-Stärke erhaltenen in Lösung gebrachten Proteine jeweils ein gleiches Volumen auf das Acrylamidgel aufgetragen. Das nach erfolgter Elektrophorese erhaltene Gel wird mindestens über Nacht mit kolloidalem Comassie (Roth, Karlsruhe, Roti-Blue Rod. Nr.: A152.1) gefärbt und anschließend in 30 % Methanol, 5 % Essigsäure, oder in 25% Methanol entfärbt.

20

10. Identifizierung und Isolierung von an P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke bindenden Proteinen

- a) Identifizierung von Proteinen mit erhöhter Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke
- 25 Proteine, die, nach Auftrennung mittels Acrylamidgelelektrophorese und anschließender Sichtbarmachung durch Färbung (siehe oben, Punkt 9. Allgemeine Methoden), ein verstärktes Signal nach Bindung an P-Stärke im Vergleich zu einem entsprechenden Signal nach Bindung an nicht-phosphorylierte-Stärke zeigen, weisen

eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke auf. Dadurch können Proteine, die eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweisen, identifiziert werden. Proteine, die eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweisen, werden aus dem Acrylamidgel ausgeschnitten.

Identifizierung der Aminosäuresequenz von Proteinen, die eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweisen

Nach Schritt a) identifizierte Proteine werden mit Trypsin verdaut und die erhaltenen Peptide zur Ermittlung der Massen der erhaltenen Peptide mittels MALDI-TOF analysiert. Trypsin ist eine sequenzspezifische Protease, d.h. Trypsin spaltet Proteine an einer vorgegebenen Stelle nur dann, wenn die betreffenden Proteine bestimmte Aminosäuresequenzen enthalten. Trypsin spaltet Peptidbindungen immer dann, wenn vom N-Terminus ausgehend die Aminosäuren Arginin und Lysin aufeinander folgen. Dadurch ist es möglich, sämtliche Peptide, die nach Trypsin Verdau einer Aminosäuresequenz entstehen würden, theoretisch zu ermitteln. Durch die Kenntnis der die theoretisch ermittelten Peptide codierenden Aminosäuren können auch die Massen der Peptide, die nach theoretischem Trypsin Verdau erhalten werden, ermittelt werden. Datenbanken (z.B. NCBI <http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm>; Swissprot <http://cbrg.inf.ethz.ch/Server/MassSearch.html>) die Informationen über die Massen von Peptiden nach theoretischem Trypsin Verdau enthalten, können daher mit den real mittels MALDI-TOF-MS erhaltenen Massen von Peptiden unbekannter Proteine verglichen werden. Aminosäuresequenzen, die gleiche Peptidmassen nach theoretischem und/oder realem Trypsin Verdau aufweisen, sind als identisch anzusehen. Die betreffenden Datenbanken enthalten sowohl Peptidmassen von Proteinen, deren Funktion bereits nachgewiesen wurde, als auch Peptidmassen von Proteinen, welche bisher nur hypothetisch durch Ableitung von Aminosäuresequenzen ausgehend von in Sequenzierprojekten erhaltenen Nucleinsäuresequenzen existieren. Die tatsächliche Existenz und die Funktion

solcher hypothetischen Proteine ist daher selten nachgewiesen und wenn überhaupt eine Funktion angegeben ist, dann beruht diese meist alleinig auf Vorhersagen, jedoch nicht auf einem tatsächlichen Nachweis der Funktion.

- Banden, enthaltend nach Schritt a) identifizierte Proteine werden aus dem
- 5 Acrylamidgel ausgeschnitten; das ausgeschnittene Acrylamidstück wird zerkleinert und durch Inkubation für ca. eine halbe Stunde bei 37°C in ca. 1 ml 60% 50mM NH_4HCO_3 , 40% Acetonitril entfärbt. Anschließend wird die Entfärbelösung abgenommen und das verbleibende Gel unter Vakuum (z.B. Speedvac) getrocknet. Nach Trocknung wird Trypsinlösung zum Verdau des in dem betreffenden Gelstück
- 10 enthaltenen Proteins hinzu gegeben. Der Verdau erfolgt über Nacht bei 37°C. Nach dem Verdau wird wenig (bis das Acrylamidgel sich weißlich färbt) Acetonitril zugegeben und der Ansatz unter Vakuum (z.B. Speedvac) getrocknet. Nach erfolgter Trocknung wird so viel 5%ige Ameisensäure zugegeben, dass die getrockneten Bestandteile gerade bedeckt sind und für einige Minuten bei 37°C inkubiert. Die
- 15 Behandlung mit Acetonitril gefolgt von der Trocknung wird einmal wiederholt. Anschließend werden die getrockneten Bestandteile in 0,1% TFA (Trifluoressigsäure, 5 µl bis 10 µl) aufgenommen und in ca. 0,5 µl Portionen auf einen Träger aufgetropft. Auf den Träger werden ebenfalls gleiche Mengen Matrix (ϵ -Cyano-4-hydroxymethylsäure) aufgegeben. Nach Auskristallisieren der Matrix werden die
- 20 Massen der Peptide mittels MALDI-TOF-MS-MS (z.B. Burker ReflexTM II, Bruker Daltonic, Bremen) ermittelt. Mit den erhaltenen Massen werden Datenbanken auf Aminosäuresequenzen hin durchsucht, welche nach theoretischem Trypsinverdau gleiche Massen ergeben. Somit können Aminosäuresequenzen identifiziert werden, welche Proteine codieren, die bevorzugt an phosphorylierte alpha-1,4-Glucane
- 25 binden und/oder P-alpha-1,4-Glucane als Substrat benötigen.

11. Verfahren zum Nachweis von Stärke phosphorylierender Aktivität eines Proteins

- a) Inkubation von Proteinen mit P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierter-Stärke
- 30 Um nachzuweisen, ob ein Protein eine Stärke phosphorylierende Aktivität aufweist, können zu untersuchende Proteine mit Stärke und radioaktiv markiertem ATP

inkubiert werden. Dazu werden ca. 5 mg P-Stärke bzw. ca. 5 mg nicht-phosphorylierte-Stärke mit dem zu untersuchenden Protein (0,01 µg bis 5,0 µg pro mg eingesetzter Stärke) in 500 µl Phosphorylierungspuffer für 10 Minuten bis 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend wird die

- 5 Reaktion durch Zugabe von SDS bis zu einer Konzentration von 2% (Gewicht/Volumen) gestoppt. Die im jeweiligen Reaktionsgemisch vorliegenden Stärkegranula werden abzentrifugiert (1 Minute, 13.000xg), einmal mit 900 µl einer 2 % SDS Lösung und jeweils viermal mit 900 µl einer 2 mM ATP Lösung gewaschen. Jeder Waschschrift wird für 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln
- 10 durchgeführt. Nach jedem Waschschrift werden die Stärkegranula durch Zentrifugation (1 Minute, 13.000xg) vom betreffenden Waschpuffer abgetrennt.

Zusätzlich sollten bei der Durchführung eines Experimentes zum Nachweis von Stärke phosphorylierender Aktivität eines Proteins weitere Reaktionsansätze, die kein Protein oder inaktiviertes Protein enthalten, ansonsten aber in gleicher Weise

15 wie die beschriebenen Reaktionsansätze behandelt werden, als so genannte Kontrollen mitgeführt werden.

b) Ermittlung der Menge an durch enzymatische Aktivität in die P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke eingebauten Phosphatreste

- 20 Die nach Schritt a) erhaltenen Stärkegranula können auf das Vorliegen von radioaktiv markierten Phosphatresten hin untersucht werden. Dazu wird die jeweilige Stärke in je 100 µl Wasser resuspendiert und mit jeweils 3 ml Scintillationscocktail (z.B. Ready Safe™, BECKMANN Coulter) versetzt und anschließend mit Hilfe eines Scintillationszählers (z.B. LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN
- 25 COULTER™) analysiert.

c) Identifizierung von Proteinen, die bevorzugt P-Stärke als Substrat verwenden

- Wird ein Protein in getrennten Ansätzen einmal mit P-Stärke und einmal mit nicht-phosphorylierter-Stärke nach der unter a) beschriebenen Methode inkubiert, so kann
- 30 durch Vergleich der nach Schritt b) erhaltenen Werte für das Vorliegen von

Stärkephosphat ermittelt werden, ob das betreffende Protein mehr Phosphat in P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke eingebaut hat. Damit können auch Proteine identifiziert werden, die Phosphat in P-Stärke, nicht jedoch in nicht-phosphorylierte-Stärke einführen können. D.h. es können Proteine identifiziert werden, die bereits phosphorylierte Stärke als Substrat für eine weitere Phosphorylierungsreaktion benötigen.

d) Zusammensetzung verwendeter Puffer

Phosphorylierungs-Puffer: 50 mM HEPES/KOH, pH 7,5

10 1 mM EDTA
6 mM MgCl₂
0,01 bis 0,5 mM ATP
0,2 bis 2 µCi pro ml randomisiertes ³³P-ATP (alternativ kann auch ATP eingesetzt werden, welches einen spezifisch in beta-Position markierten Phosphatrest enthält)

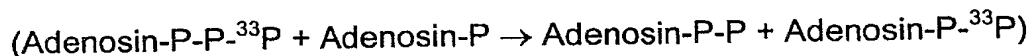
15 Unter dem Begriff „randomisiertes ATP“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ATP verstanden werden, welches sowohl in gamma-Position, als auch in beta-Position markierte Phosphatreste enthält (Ritte et al. 2002, PNAS 99, 7166-7171). Randomisiertes ATP wird in der wissenschaftlichen Literatur auch als Beta/gamma-ATP bezeichnet. Eine Methode zur Herstellung von randomisiertem ATP ist im Folgenden beschrieben.

i) Herstellung von randomisiertem ATP

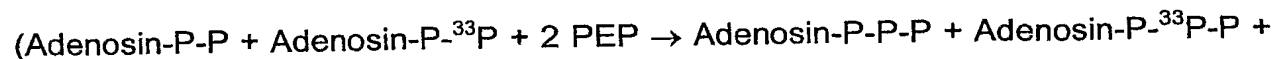
25 Der hier beschriebenen Methode zur Herstellung von randomisiertem ATP mit Hilfe von Enzym katalysierten Reaktionen liegen folgende Reaktionsmechanismen zu Grunde:

1. Reaktionsschritt:





2. Reaktionsschritt:



5 2 Pyruvat)

Die Reaktionsgleichgewichte liegen auf Produktseite, trotzdem entsteht bei dieser Reaktion eine Mischung aus größtenteils $\beta^{33}\text{P-ATP}$ und etwas $\gamma^{33}\text{P-ATP}$.

ii) Durchführung des 1. Reaktionsschrittes

- 10 ATP (100 μCi , 3000 Ci pro mmol), welches einen in gamma-Position mit ^{33}P markierten Phosphatrest enthält (Hartmann Analytic, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$), wird mit 2 μl Myokinase (AMP-phosphotransferase, aus Kaninchen Muskel; SIGMA, Prod. Nr.: M3003 3,8 mg/ml, 1,626 Units/mg) in 90 μl Randomisierungspuffer für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Inkubation für 12 Minuten bei 15 95°C gestoppt, bevor der Reaktionsansatz mittels Zentrifugalfiltration über einen Microcon YM 10 Filter (Amicon, Millipore Prod. Nr. 42407) bei 14.000xg für mindestens 10 Minuten aufgereinigt wird.

iii) Durchführung des 2. Reaktionsschrittes

- 20 Dem in Schritt ii) erhaltenen Filtrat werden 2 μl Pyruvatkinase (zur Herstellung einer entsprechenden Lösung siehe unten) und 3 μl 50 mM PEP (Phosphoenolpyruvat) zugegeben. Dieses Reaktionsgemisch wird für 45 Minuten bei 30°C inkubiert, bevor die Reaktion durch Inkubation bei 95°C für 12 Minuten gestoppt wird. Anschließend wird das Reaktionsgemisch zentrifugiert (2 Minuten, 12.000 rpm in einer 25 Eppendorftischzentrifuge). Der nach Zentrifugation erhaltene, randomisierte ATP enthaltende Überstand wird abgenommen, aliquotiert und kann bei -20°C gelagert werden.

Herstellung der Pyruvatkinase Lösung

15 µl Pyruvatkinase (aus Kaninchenmuskel, Roche, Prod. Nr. 12815), 10 mg/ml, 200 Units/mg bei 25 °C) werden abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 27 µl Pyruvatkinasepuffer aufgenommen.

iv) Verwendete Puffer

5 Pyruvatkinasepuffer: 50 mM HEPES/KOH pH 7,5
1 mM EDTA

Randomisierungspuffer: 100 mM HEPES/KOH pH 7,5
1 mM EDTA

10 10 % Glycerol
5 mM MgCl₂
5 mM KCl
0,1 mM ATP
0,3 mM AMP

15

12. Nachweis der Autophosphorylierung eines Proteins

Um nachzuweisen, ob ein Protein eine autophosphorylierende Aktivität aufweist, können zu untersuchende Proteine mit radioaktiv markiertem ATP inkubiert werden. Dazu werden zu untersuchende Proteine (50 µg bis 100 µg) in 220 µl
20 Phosphorylierungspuffer (siehe oben, Punkt 12 d), Allgemeine Methoden) für 30 Minuten bis 90 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von EDTA bis zu einer Endkonzentration von 0,11 M gestoppt. Ca. 2 µg bis 4 µg Protein werden mit Hilfe denaturierender
25 Polyacrylamidgelelektrophorese (7,5%iges Acrylamidgel) aufgetrennt. Das nach Polyacrylamidgelelektrophorese erhaltene Gel wird einer Autoradiographie unterzogen. Proteine, die in der Autoradiographie ein Signal zeigen, tragen einen radioaktiven Phosphatrest.

13. Identifizierung der C-Atom-Positionen der Glucosemoleküle eines alpha-1,4-Glucans, in welche Phosphatreste durch ein Stärke phosphorylierendes Protein eingeführt werden

Welche C-Atom-Positionen der Glucosemoleküle eines alpha-1,4-Glucans von einem Protein phosphoryliert werden, kann durch Hydrolyse der durch ein betreffendes Protein *in vitro* phosphorylierten erhaltenen Glucane, anschließender Auftrennung der nach Hydrolyse erhaltenen Glucosemonomere, gefolgt von Messung des durch ein betreffendes Protein eingebautes Phosphat in bestimmte Fraktionen der Glucosemoleküle geführt nachgewiesen werden.

10

a) Totalhydrolyse der alpha-1,4-Glucane

Alpha-1,4-Glucan enthaltende Wasser-Suspensionen werden zentrifugiert, das sedimentierte Pellet anschließend in 0,7 M HCl (Baker, zur Analyse) resuspendiert und unter Schütteln für 2 Stunden bei 95°C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation werden die Proben kurz abgekühlt und zentrifugiert (z.B. 2 Minuten 10.000xg). Der erhaltene Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 2 M NaOH (Baker, zur Analyse) neutralisiert. Falls ein Pellet zurück bleibt, wird es in 100 µl Wasser resuspendiert und die Menge des darin vorliegenden markierten Phosphates zur Kontrolle bestimmt.

15

Der neutralisierte Überstand wird anschließend über einen 10 kDa Filter zentrifugiert. Durch Messung eines Aliquots des erhaltenen Filtrates wird die Menge an markiertem Phosphat im Filtrat z.B. mit Hilfe eines Scintillationszählers bestimmt.

20

b) Fraktionierung der Hydrolyseprodukte und Ermittlung der phosphorylierten C-Atom Positionen

25

Die mittels Schritt a) erhaltenen neutralisierten Filtrate der Hydrolyseprodukte können (bei Verwendung von radioaktiv markiertem ATP etwa 3.000 cpm) mit Hilfe von z.B. Hoch-Druck-Anionenaustausch-Chromatographie (HPAE) aufgetrennt werden. Zur Einstellung des für die HPAE benötigten Volumens kann das neutralisierte Filtrat mit H₂O verdünnt werden. Weiterhin wird den entsprechenden Filtraten als interne

30

Kontrolle jeweils Glucose-6-Phosphat (ca. 0,15 mM) und Glucose-3-Phosphat (ca. 0,3 mM) zugegeben. Die Auftrennung mittels HPAE kann z.B. mit Hilfe einer Dionex Anlage DX 600 Bio Lc unter Verwendung einer CarboPac PA 100 Säule (mit entsprechender Vorsäule) und eines gepulsten amperometrischen Detektors (ED 50) Detektors erfolgen. Dabei wird vor Injektion der Probe die Säule zunächst für 10 Minuten mit 99% Eluent C und 1% Eluent D gespült. Anschließend werden jeweils 60 µl Probenvolumen injiziert. Die Elution der Probe erfolgt durch folgende Bedingungen:

Flußrate: 1 ml pro Minute

10 Gradient: linear ansteigend von 0 Minuten bis 30 Minuten

	Eluent C	Eluent D
0 Minuten	99%	1%
30 Minuten	0%	100%
35 Minuten	0%	100%

15 Stop des Laufes

Die von der Säule eluierten Hydrolyseprodukte werden in einzelnen Fraktionen von je 1 ml aufgefangen. Da den injizierten Proben der Hydrolyseprodukte jeweils nicht markiertes Glucose-3-Phosphat (Ritte et al. 2002, PNAS 99, 7166-7171) und nicht markiertes Glucose-6-Phosphat (Sigma, Prod. Nr.: G7879) als interne Standards zugemischt wurden, können mittels gepulster amperometrischer Detektion die Fraktionen ermittelt werden, welche entweder Glucose-3-Phosphat oder Glucose-6-Phosphat enthalten. Durch Messung der Menge an markierten Phosphaten in den einzelnen Fraktionen und anschließendem Vergleich mit den Fraktionen, welche Glucose-3-Phosphat oder Glucose-6-Phosphat enthalten, können damit diejenigen Fraktionen ermittelt werden, in welchen markiertes Glucose-6-Phosphat oder markiertes Glucose-3-Phosphat enthalten ist. Die Menge des markierten Phosphates in den betreffenden Fraktion wird bestimmt. Durch die Verhältnisse der für markiertes Phosphat gemessenen Mengen an Glucose-3-Phosphat zu Glucose-6-Phosphat in den einzelnen Hydrolyseprodukten, kann nun ermittelt werden, welche C-Atom-

Position von einem alpha-1,4-Glucan phosphorylierenden Enzym bevorzugt phosphoryliert wird.

c) Verwendete Puffer

5 Eluent C: 100 mM NaOH

Eluent D: 100 mM NaOH

500 mM Natriumacetat

10 **14. Transformation von Reispflanzen**

Reispflanzen wurden nach der von Hiei et al. (1994, Plant Journal 6(2), 271-282) beschriebenen Methode transformiert.

15. Transformation von Kartoffelpflanzen

15 Kartoffelpflanzen wurden mit Hilfe von Agrobakterium, wie bei Rocha-Sosa et al. (EMBO J. 8, (1989), 23-29) beschrieben, transferiert.

16. Bestimmung des Stärkegehaltes aus Blattmaterial

a) Probenvorbereitung:

20 Entfernung der löslichen Zucker durch ethanolische Extraktion:

Ca. 1 g frisches Blattmaterial von Pflanzen wird gefriergetrocknet, gewogen und anschließend mit einer Kugelmühle zu einem feinen Pulver homogenisiert. Ca. 50 mg pulverisiertes Blattmaterial (Doppelbestimmung) werden eingewogen, mit 1 ml 80% Ethanol versetzt, stark geschüttelt und die homogene Dispersion 1 Stunde bei 25 80°C im Wasserbad inkubiert. Nach Abkühlen auf ca. 40°C wird die Dispersion 5 Minuten bei 3000 U/min (Minifuge RF, Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wird

verworfen. Das Blattmaterial wird noch 2 mal mit je 1 ml 80% Ethanol versetzt und je 20 Minuten bei 80°C im Wasserbad inkubiert. Nach Abkühlen und Zentrifugieren (s.o.) werden die Überstände jeweils verworfen.

(b) Stärkebestimmung in Mikrotiterplatte/Spectramax bei 340 nm:

- 5 Die Bestimmung erfolgt mit Hilfe des Stärke Lebensmittelanalytik UV-Test, Boehringer Mannheim, Best. Nr.: 207748 (Amyloglucosidase, Stärkemesspuffer, Glucose-6-phosphatdehydrogenase).

- Das zuckerfreie Blattmaterial wird mit 400 µl 0,2 N KOH versetzt und durch starkes Schütteln homogenisiert. Das Homogenat wird 1 Stunde bei 95°C im Wasserbad
10 inkubiert. Nach dem Abkühlen werden 75 µl 1M Essigsäure dazugegeben und gründlich gemischt. Es wird 10 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. 25 bzw. 50 µl Überstand werden in eine Mikrotiterplatte zu 50 µl Amyloglucosidase (Boehringer Mannheim) sowie 25 bzw. 50 µl Millipore Wasser gegeben und bei 56°C 1 Stunde
15 verdaut. In eine weitere Mikrotiterplatte werden 196 µl Stärkemesspuffer (Boehringer Mannheim) vorgelegt. Dazu werden 4 (bis 20) µl des abgekühlten Stärkeverdaus pipettiert. Das Verhältnis kann je nach Glucosekonzentration bis auf 40 µl Verdau + 160 µl Stärkemesspuffer angehoben werden.

Messung: Schütteln, Preread

+ 2 µl Glucose-6-phosphatdehydrogenase (Boehringer Mannheim)

- 20 Inkubation: 30 Minuten bei 37°C, messen

(c) Die Berechnung des Stärkegehaltes erfolgt wie nachstehend angegeben:

Messvolumen (200 µl) x Extraktionsvol. (4750 µl) x Amyloglucosidase-Verdauvol. (200 µl) x $\Delta OD/\epsilon$ x 1000 x Probemessvol. (4 µl...40 µl) x Probeverdauvol. (50 µl) x Einwaage (g) x d(1) = Konzentration (µmol/g Trockengewicht)

- 25 $\epsilon = 6,3 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (molarer Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm)

Aus den ermittelten Gewichten vor und nach dem Gefriertrocknen sowie der molaren Masse von Glucose (162,1 g/mol – Anhydrid) wird die Konzentration in mg Glucose / g Frischgewicht errechnet.

17. Färbung von Pflanzenteilen mit Lugol'scher Lösung

Zu untersuchende Pflanzenteile werden den Pflanzen entnommen und in 80% Ethanol bei 50°C inkubiert, bis die Pflanzenteile keinen grünen Blattfarbstoff mehr enthalten. Anschließend werden die Pflanzenteile in Lugol'scher Lösung inkubiert, bevor überschüssige Lugol'sche Lösung mit Wasser von den Pflanzenteilen abgespült wird. Pflanzenteile, die Stärke enthalten, weisen eine bräunliche bis schwarze Färbung auf. Je intensiver die Färbung ist, desto mehr Stärke enthalten die betreffenden Pflanzenteile.

10 Beispiele

1. Isolierung eines Proteins aus *Arabidopsis thaliana*, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweist

a) Herstellung von Proteinextrakten aus *Arabidopsis thaliana*

15 Proteinextrakte wurden aus etwa 7 g Blättern (**Frischgewicht**) von *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp Columbia, Col-O) nach dem unter Punkt 1, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren hergestellt.

20 b) Isolierung von Stärkegranula aus Blättern von *sex1-3* Mutanten von *Arabidopsis thaliana*

Stärkegranula wurden aus etwa 20 g (Frischgewicht) aus Blättern einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* nach dem unter Punkt 2., Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren isoliert.

25 c) *In vitro* Phosphorylierung von Stärke, isoliert aus einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* mit gereinigtem R1 Protein

Etwa 30 mg nicht-phosphorylierte-Stärke, isoliert aus einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* wurde nach dem unter Punkt 7., Allgemeine Methoden

beschriebenen Verfahren mittels eines rekombinant in *E. coli* exprimierten und gereinigten R1 Proteins phosphoryliert. Zur Expression des R1 Proteins in *E. coli* und zur anschließenden Aufreinigung wurden die bei Ritte et al. (2002, PNAS 99, 7166-7171) beschriebenen Verfahren verwendet.

5

d) Isolierung von Proteinen, die an P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke binden

Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Schritt a) wurden in einem Ansatz A mit 50 mg der nach Schritt c) hergestellten *in vitro* phosphorylierten Stärke nach dem unter Punkt 8 a), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren inkubiert und gewaschen.

In einem zweiten Ansatz B wurden Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Schritt a) mit 50 mg der nach Schritt b) hergestellten nicht-phosphorylierten-Stärke nach dem unter Punkt 8 a), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren inkubiert und gewaschen.

Anschließend wurden die an P-Stärke des Ansatzes A und die an nicht-phosphorylierte-Stärke des Ansatzes B nach dem unter Punkt 8 b), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren in Lösung gebracht.

In einem dritten Ansatz C wurden 50 mg der nach Schritt c) hergestellten *in vitro* phosphorylierten Stärke nach dem unter Punkt 8 a), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren inkubiert und gewaschen. Ansatz C enthielt jedoch keinen Proteinextrakt.

e) Auftrennung der nach Schritt d) erhaltenen Proteine mittels Acrylamidgelelektrophorese

Die in Schritt d) erhaltenen Proteine der Ansätze A, B und C wurden mittels einem 9%igem Acrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen (SDS) nach dem unter Punkt 9., Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren aufgetrennt und anschließend mit Comassie Blau gefärbt. Das gefärbte Gel ist in Fig. 1 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass ein Protein, welches im denaturierenden Acrylamidgel

bezogen auf eine Proteinstandardmarker (Spur M) ein Molekulargewicht von ca. 130 kDa aufweist, bevorzugt an phosphorylierte Stärke Spur P) im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke (K) bindet.

- 5 f) Identifizierung des Proteins, das bevorzugt an P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke bindet

Die in Schritt e) identifizierte Bande des Proteins mit einem Molekulargewicht von ca. 130 kDa wurde aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend wurde das Protein wie unter Allgemeine Methoden 10 b) beschrieben, aus dem Acrylamid herausgelöst, mit

- 10 Trypsin verdaut und die erhaltenen Peptidmassen mittels MALD-TOF-MS bestimmt. Der durch MALDI-TOF-MS erhaltene so genannte „Fingerprint“ wurde mit in Datenbanken (Mascot: http://www.matrixscience.com/search_form_select.html; ProFound: http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe; PepSea: <http://195.41.108.38/PepSeaIntro.html>) enthaltenen Fingerprints theoretisch
- 15 verdauter Aminosäuremoleküle verglichen. Da ein solcher Fingerprint sehr spezifisch für ein Protein ist, konnte ein Aminosäuremolekül identifiziert werden. Mit Hilfe der Sequenz dieses Aminosäuremoleküls konnte eine ein OK1 Protein codierende Nucleinsäuresequenz aus *Arabidopsis thaliana* isoliert werden. Das mit diesem Verfahren identifizierte Protein wurde mit A.t.-OK1 bezeichnet. Nach Analyse der
- 20 Aminosäuresequenz des OK1 Proteins aus *Arabidopsis thaliana*, ergab sich, dass diese von der in der Datenbank vorliegenden Sequenz (NP 198009, NCBI) abweicht. Die in SEQ ID No 2 dargestellte Aminosäuresequenz codiert das A.t.-OK1 Protein. SEQ ID No 2 enthält im Vergleich mit der Sequenz der Datenbank (Acc.: NP 198009.1, NCBI) Abweichungen. Die in SEQ ID No 2 enthaltenen Aminosäuren 519
- 25 bis 523 (WRLCE) und 762 bis 766 (VRARQ) sind nicht in der Sequenz, welche in der Datenbank vorliegt (ACC.: NP 198009.1) enthalten. Gegenüber der Version 2 der Datenbanksequenz (Acc.: NP 198009.2) enthält die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz noch die zusätzlichen Aminosäuren 519 bis 523 (WRLCE).

2. Klonierung einer cDNA, die das identifizierte OK1 Protein codiert

- 30 Die A.t.-OK1 cDNA wurde mit Hilfe reverser PCR unter Verwendung von mRNA, isoliert aus Blättern von *Arabidopsis thaliana* isoliert. Dazu wurde ein cDNA Strang

mittels reverser Transkriptase SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT PCR, Invitrogen Prod. Nr.: 11904-018) synthetisiert, welcher dann unter Verwendung von DNA Polymerase amplifiziert (Expand High Fidelity PCR Systems, Roche Prod. Nr.: 1732641) wurde. Das erhaltene Amplifikat dieser PCR Reaktion wurde in den

5 Vektor pGEM®-T (Invitrogen Prod. Nr.: A3600) kloniert. Das erhaltene Plasmid wird mit A.t.-OK1-pGEM bezeichnet, die das A.t.-OK1 Protein codierende cDNA Sequenz wurde ermittelt und ist unter SEQ ID NO. 1 dargestellt.

Die unter SEQ ID NO 1 dargestellte Sequenz entspricht nicht der Sequenz, die in der Datenbank enthalten ist. Diese wurde oben bereits für die Aminosäuresequenz,

10 codierend ein A.t.-OK1 Protein diskutiert.

Verwendete Bedingungen für die Amplifikation der cDNA codierend das A.t.-OK1 Proteins

Erststrangsynthese:

Es wurden die vom Hersteller angegebenen Bedingungen und Puffer verwendet. Der

15 Reaktionsansatz für die Erststrangsynthese enthielt außerdem folgende Substanzen:

3 µg Gesamt-RNA

5 µM 3'-Primer (OK1rev1: 5'-GACTCAACCACATAACACACAAAGATC)

0,83 µM dNTP Mix

Der Reaktionsansatz wurde für 5 Minuten bei 75°C inkubiert und anschließend auf

20 Raumtemperatur abgekühlt.

Anschließend wurden 1st Strand buffer, RNase Inhibitor und DTT zugegeben und für 2 Minuten bei 42°C inkubiert, bevor 1 µL Superscript RT DNA Polymerase zugegeben wurde und der Reaktionsansatz für 50 Minuten bei 42°C inkubiert wurde.

Bedingungen Für die Amplifikation des Erststranges mittels PCR:

25 1 µL des Reaktionsansatzes der Erststrangsynthese

0.25 µM 3'Primer (OK1rev2: 5'- TGGTAACGAGGCAAATGCAGA)

0.25 µM 5'Primer (OK1fwd2: 5'- ATCTCTTATCACACCACCTCCAATG)

Reaktionsbedingungen:

- Schritt 1 95°C 2 min
- Schritt 2 94°C 20 sec
- Schritt 3 62°C 30 sec (Temp. pro Zyklus -0.67°C) (30 s), 68°C (
- Schritt 4 68°C 4 Minuten
- 5 Schritt 5 94°C 20 sec
- Schritt 6 56°C 30 sec
- Schritt 7 68°C 4 Minuten
- Schritt 8 68°C 10 Minuten

Zunächst wurde die Reaktion nach den Schritten 1 bis 4 durchgeführt. Zwischen
10 Schritt 4 und Schritt 2 folgten 10 Wiederholungen (Zyklen), wobei die Temperatur
des Schrittes 3 nach jedem Zyklus um 0,67°C verringert wurde. Anschließend
erfolgte die Reaktion nach den in Schritten 5 bis 8 angegebenen Bedingungen.
Zwischen Schritt 7 und Schritt 5 folgten 25 Wiederholungen (Zyklen), wobei die Zeit
des Schrittes 7 je Zyklus um 5 sec verlängert wurde. Nach erfolgter Reaktion wurde
15 die Reaktion auf 4°C gekühlt.

3. Herstellung eines Vektors, zur rekombinanten Expression der cDNA des OK1 Proteins

Die Sequenz codierend das OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* wurde nach
Amplifikation mittels PCR durch Verwendung des Plasmides A.t.-OK1-pGEM als
20 Template unter Verwendung der Gateway Technologie (Invitrogen) zunächst in den
Vektor pDONORTM 201 (Invitrogen Prod. Nr.: 11798-014) kloniert. Anschließend
wurde die codierende Region des OK1 Proteins aus dem erhaltenen Vektor durch
sequenzspezifische Rekombination in den Expressionsvektor pDEST17TM (Invitrogen
Prod. Nr.: 11803-014) kloniert. Der erhaltene Expressionsvektor wird mit A.t.-OK1-
25 pDESTTM17 bezeichnet. Durch die Klonierung entstand eine translationale Fusion der
das A.t.-OK1 Protein codierenden cDNA mit in dem Expressionssvektor pDESTTM17
vorliegenden Nucleotiden. Die aus dem Vektor pDESTTM17 stammenden Nucleotide,
die mit der cDNA codierend das A.t.-OK1 Protein translational fusioniert sind,
codieren 21 Aminosäuren. Diese 21 Aminosäuren umfassen u.a. das Start Codon

(ATG) und einen so genannten His-tag (6 Histidinreste direkt hintereinander). Nach Translation dieser translational fusionierten Sequenzen entsteht dadurch ein A.t.-OK1 Protein, welches an seinem N-terminus die zusätzlichen 21 Aminosäuren, codiert durch Nucleotide, stammend aus dem Vektor aufweist. Das aus diesem Vektor resultierende rekombinante A.t.-OK1-Protein enthält daher 21, aus dem Vektor pDEST™17 stammende, zusätzliche Aminosäuren an seinem N-Terminus.

4. Heterologe Expression des OK1 Proteins in *E. coli*

Der nach Beispiel 3 erhaltene Expressionsvektorektor A.t.-OK1-pDEST™17 wurde in den *E. coli* Stamm BL21 Star™ (DE3) (Invitrogen, Prod. Nr. C6010-03) transformiert. Eine Beschreibung dieses Expressionssystems ist bereits weiter oben (siehe Punkt 3., Allgemeine Methoden) erfolgt. Aus der Transformation resultierende Bakterienklone, enthaltend den Vektor A.t.-OK1-pDEST™17, dienen zunächst zur Herstellung einer Vorkultur, die anschließend zur Beimpfung einer Hauptkultur verwendet wurde (siehe Punkt 3.c), Allgemeine Methoden). Vorkultur und Hauptkultur wurden jeweils bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert. Nachdem die Hauptkultur eine OD₆₀₀ von ca. 0,8 erreicht hatte wurde die Expression des rekombinanten A.t.-OK1 Proteins durch Zugabe von IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid) bis zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Nach Zugabe von IPTG wird die Hauptkultur bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von ca. 1,8 erreicht war. Anschließend wurde die Hauptkultur für 30 Minuten auf Eis gekühlt, bevor die Zellen der Hauptkultur durch Zentrifugation (10 Minuten bei 4.000xg und 4°C) vom Kulturmedium abgetrennt wurden.

5. Reinigung des rekombinant exprimierten OK1 Proteins

Die Reinigung und Aufkonzentration des A.t.-OK1 Proteins aus Zellen, erhalten nach Beispiel 4, wurde nach dem unter Punkt 4, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren durchgeführt.

6. Nachweis von Stärke phosphorylierender Aktivität des OK1 Proteins

Der Nachweis der Stärke phosphorylierenden Aktivität des A.t.-OK1 Proteins erfolgte nach dem unter Punkt 11, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren. Dabei wurden jeweils 5 µg von nach Beispiel 5 hergestelltem, gereinigtem A.t.-OK1 Protein, in einem Ansatz A mit 5 mg Stärke, isoliert aus einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* nach Beispiel 1 b) und in einem Ansatz B mit 5 mg Stärke, erhalten durch enzymatische Phosphorylierung nach Beispiel 1 c) in jeweils 500 µl Phosphorylierungspuffer enthaltend 0,05 mM radioaktiv (^{33}P) markiertes, randomisiertes ATP (insgesamt 1.130.00 cpm, ca. 0,55 µCi) für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz C, welcher dem Ansatz B entsprach, jedoch kein OK1 Protein enthielt, ansonsten aber in gleicher Weise behandelt wurde, wie die Ansätze A und B. Für alle Ansätze (A, B, C) wurden jeweils zwei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

Mittels Verwendung eines Scintillationszählers wurden die Stärken aus den Ansätzen A, B, und C auf das Vorliegen von radioaktiv markiertem Phosphat hin untersucht (siehe Punkt 11 b), Allgemeine Methoden). Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 und in Fig. 3 dargestellt.

	Gemessene Radioaktivität [cpm]	
	Versuch 1	Versuch 2
Ansatz A (nicht-phosphorylierte Stärke + OK1)	42	47
Ansatz B (phosphorylierte Stärke + OK1)	7921	8226
Ansatz C (phosphorylierte Stärke ohne Protein)	56	53

Tabelle 1: Nachweis einer Stärke phosphorylierenden Aktivität des Ok1 Proteins

Aus den erhaltenen Ergebnissen ist erkennbar, dass das OK1 Protein keine Phosphatgruppen von ATP auf Stärke überträgt, wenn nicht-phosphorylierte-Stärke als Substrat angeboten wird, da der in cpm gemessene Anteil der durch ein OK1 Protein auf nicht-phosphorylierte-Stärke übertragenen Phosphatgruppen den Anteil der radioaktiv markierten Phosphatgruppen in Ansatz C (Kontrolle) nicht übersteigt. Wird hingegen P-Stärke als Substrat angeboten, ist der in cpm gemessene Anteil an radioaktiven Phosphatgruppen, welcher von ATP auf P-Stärke übertragen wird, signifikant höher. Daraus ist ersichtlich, dass das OK1 Protein P-Stärke als Substrat benötigt und dass nicht-phosphorylierte-Stärke nicht als Substrat von dem OK1 Protein akzeptiert wird.

Wird der oben dargestellte Versuch mit spezifisch in gamma-Position mit ^{33}P markiertem ATP durchgeführt, so kann kein Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat in die Stärke festgestellt werden. Daraus ergibt sich, dass der beta-Phosphatrest des ATP von einem OK1 Protein auf Stärke übertragen wird. Die Ergebnisse eines solchen Versuches sind in Fig. 6 dargestellt.

7. Nachweis der Autophosphorylierung

Der Nachweis der Autophosphorylierung des A.t.-OK1 Proteins erfolgte mittels der weiter oben beschriebenen Methode (siehe Punkt 12, Allgemeine Methoden). Dabei wurden 50 µg gereinigtes A.t.-OK1 Protein mit radioaktiv markiertem, randomisiertem ATP in 220 µl Phosphorylierungspuffer (siehe oben, Punkt 12 d), Allgemeine Methoden) bei Raumtemperatur für 60 Minuten unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden den Inkubationsansätzen jeweils 100 µl entnommen und in vier frische Reaktionsgefäße überführt. In Reaktionsgefäß 1 wurde die Reaktion durch Zugabe von je 40 µl 0,11M EDTA gestoppt. Reaktionsgefäß 2 wurde bei 95°C für 5 Minuten inkubiert. Zu Reaktionsgefäß 3 wurde HCl bis zu einer Endkonzentration von 0,5 M zugegeben und zu Reaktionsgefäß 4 wurde NaOH bis zu einer Endkonzentration von 0,5 M zugegeben. Die Reaktionsgefäße 3 und 4 wurden jeweils für 25 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 50 µl der Reaktionsgefäße 1, 2, 3 und 4 entnommen, mit SDS Probenpuffer versetzt und

mittels SDS-Acrylamidgelelektrophorese (7,5%iges Acrylamidgel) aufgetrennt. Dazu wurden Proben der Reaktionsgefäße auf jeweils zwei identische Acrylamidgele aufgetragen. Eines der nach erfolgter Elektrophorese erhaltenen Gele wurde einer Autoradiographie unterzogen, während das zweite Gel mit Comassie Blau gefärbt wurde.

In dem mit Comassie Blau gefärbten Gel (siehe Fig. 2A)) ist deutlich zu erkennen, dass die Behandlung mit 0,5 M NaOH zu einem Abbau des OK1 Proteins führt. Das OK1 Protein ist daher als labil gegenüber NaOH zu bezeichnen. Inkubation bei 30°C, 95°C und mit 0,5 M HCl zeigen, dass das OK1 Protein unter den genannten Inkubationsbedingungen relativ stabil ist. Dieses ist daraus zu schließen, dass bei diesen Inkubationsbedingungen jeweils etwa gleiche Mengen OK1 Protein nach Comassie Blau Färbung im betreffenden Gel nachgewiesen werden können.

In der Autoradiographie (siehe Abb. 2B)) ist durch Vergleich mit bei 30°C inkubiertem phosphoryliertem OK1 Protein zu erkennen, dass eine Inkubation des phosphorylierten OK1 Proteins bei 95°C zu einer deutlichen Reduzierung des Phosphates, welches an das OK1 Protein gebunden ist, führt. Die Bindung zwischen dem Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins ist daher als Hitzelabil zu bezeichnen. Weiterhin ist eine leichte Abnahme des an das OK1 Protein gebundenen Phosphates ebenfalls bei Inkubation mit 0,5 M HCl und 0,5 M NaOH im Vergleich mit bei 30°C inkubiertem phosphoryliertem OK1 Protein zu beobachten. Wird die Tatsache berücksichtigt, dass die Menge des OK1 Proteins in der Autoradiographie nach Behandlung mit 0,5 M NaOH wegen der Labilität des OK1 Proteins gegenüber NaOH wesentlich geringer ist, als in den mit Hitze und Säure behandelten Proben, so kann geschlossen werden, dass die Bindung zwischen dem Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins relativ stabil gegenüber Basen ist. Da die mit Säure behandelte Probe etwa gleiche Proteinmengen wie die bei 30°C und bei 95°C inkubierte Probe enthält, jedoch ein signifikant geringeres Signal als die mit 30°C behandelte Probe in der Autoradiographie aufweist, ist davon auszugehen, dass auch saure Inkubationsbedingungen die Bindung zwischen einem Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins zu einem gewissen Maße spalten. Daher konnte in den durchgeführten Versuchen auch eine Labilität der Bindung zwischen einem Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins

festgestellt werden. Die Labilität gegenüber Säuren ist dabei jedoch wesentlich weniger ausgeprägt als die Labilität gegenüber Hitze.

Bindungen zwischen der Aminosäure Histidin und Phosphat sind Hitzelabil, Säurelabil aber Basestabil (Rosenberg, 1996, Protein Analysis and Purification, Birkhäuser, Boston, 242-244). Die oben beschriebenen Ergebnisse sind daher ein Hinweis darauf, dass durch Autophosphorylierung eines OK1 Proteins ein Phosphohistidin entsteht.

Wird rekombinant exprimiertes OK1 Protein wie oben beschrieben mit spezifisch in gamma-Position mit ^{33}P markiertem ATP inkubiert, so kann keine Autophosphorylierung festgestellt werden. Fig. 5 A) zeigt die Menge an Protein, die nach den betreffenden Inkubationsschritten mittels Western Blot Analyse in dem jeweiligen Reaktionsansatz noch nachgewiesen werden kann. Fig. 5 B) zeigt eine Autoradiographie von Protein aus den einzelnen Reaktionsansätzen. Es ist zu erkennen, dass bei Verwendung von spezifisch in der gamma-Position markiertem ATP keine Autophosphorylierung des OK1 Proteins auftritt, während bei Verwendung von randomisiertem ATP eine Autophosphorylierung nachgewiesen werden kann. Dieses bedeutet, dass bei der Autophosphorylierung eines OK1 Proteins der Phosphatrest der beta-Position des ATP kovalent an eine Aminosäure des OK1 Proteins gebunden wird.

20

8. Nachweis der von einem OK 1 Protein phosphorylierten C-Atom-Positionen der Glucosemoleküle von Stärke

a) Herstellung von phosphorylierter-Stärke

Phosphorylierte Stärke wurde nach Punkt 7, Allgemeine Methoden hergestellt. Es wurden dazu in einem Ansatz A 5 mg nicht phosphorylierte Stärke, isoliert aus Blättern einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* mit 25 µg gereinigtem A.t.-OK1 Protein und in einem zweiten Ansatz B 5 mg *in vitro* phosphorylierter-Stärke ursprünglich isoliert aus Blättern einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana*) mit 5 µg gereinigtem R1 Protein eingesetzt. Die Reaktion erfolgte jeweils in 500 µl Phosphorylierungspuffer, der jeweils ^{33}P markiertes ATP (ca. $2,5 \times 10^6$ cpm) enthielt,

30

durch Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Stunde unter Schütteln. Zusätzlich wurde ein Kontrollansatz, welcher 5 mg Stärke, isoliert aus Blättern einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* und den genannten Phosphorylierungspuffer, jedoch kein Protein enthielt, verwendet. Der Kontrollansatz wurde genauso behandelt, wie die

5 Ansätze A und B. Die einzelnen Reaktionen wurden durch Zugabe von jeweils 125 µl 10% SDS gestoppt und mit je 900 µl einmal mit 2% SDS, fünfmal mit 2 mM ATP und zweimal mit H₂O gewaschen. Nach jedem Waschschrift erfolgte eine Zentrifugation (jeweils 2 Minuten in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 13.000 rpm). Die erhaltenen Stärkepellets wurden jeweils in 1 ml H₂O resuspendiert und 100 µl jedes

10 Ansatzes wurden nach Zugabe von 3 ml Scintillationscocktail (Ready Safe™, BECKMANN) versetzt und anschließend mit Hilfe eines Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTER™) vermessen.

Die Messung ergab folgende Ergebnisse:

	Kontrolle:	63 cpm/100 µL	630 cpm/1000 µl
15	Ansatz A (OK1):	1351 cpm/100 µl	13512 cpm/1000 µl
	Ansatz B (R1):	3853 cpm/100 µl	38526 cpm/1000 µl

b) Totalhydrolyse der P-Stärke

Die nach Schritt a) erhaltenen Suspensionen der Ansätze A, B und C wurden erneut

20 zentrifugiert (5 Minuten in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 13.000 rpm), die erhaltenen Pellets in 90 µl 0,7 M HCl (Baker, zur Analyse) resuspendiert und anschließend für 2 Stunde bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze A, B und C erneut zentrifugiert (5 Minuten in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 13.000 rpm), und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Sedimentierte

25 Rückstände der Ansätze wurden in jeweils 100 µl H₂O resuspendiert und nach Zugabe von je 3 ml Scintillationscocktail (Ready Safe™, BECKMANN) mit Hilfe eines Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTER™) vermessen. In keinem der Rückstände konnten signifikante Mengen an Radioaktivität nachgewiesen werden, was bedeutet, dass sich alle mit radioaktivem

30 Phosphat markierten Hydrolyseprodukte im Überstand befinden.

Danach erfolgte die Neutralisation der einzelnen Überstände, enthaltend die Hydrolyseprodukte, durch Zugabe von jeweils 30 µl 2 M NaOH (die Menge der zur Neutralisation benötigten Menge von NaOH wurde vorher an Blindproben ausgetestet): Die neutralisierten Hydrolyseprodukte wurden auf einen 10 kDa
5 Microcon-Filter, der vorher zweimal mit je 200 µl H₂O gespült wurde, gegeben und für ca. 25 Minuten bei 12.000 rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Von dem erhaltenen Filtrat (jeweils ca. 120 µl) wurden je 10 µl abgenommen, die nach Zugabe von je 3 ml Scintillationscocktail (Ready SafeTM, BECKMANN) mit
10 Hilfe eines Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTERTTM) vermessen wurden. Die Bestimmung der in den einzelnen Ansätzen vorliegenden Aktivität ergab dabei folgende Ergebnisse:

Ansatz A (OK1):	934 cpm/10 µl	11.208 cpm/120 µl	93 cpm/µl
Ansatz B (R1):	2518 cpm/10 µl	30.216 cpm/120 µl	252 cpm/µl

15 c) Auftrennung der Hydrolyseprodukte

Die Auftrennung der nach Schritt b) erhaltenen Hydrolyseprodukte wurde mittels HPAE unter Verwendung einer Dionex Anlage unter den oben angegebenen Bedingungen (siehe (Allgemeine Methoden Punkt 13 c)) durchgeführt.. Die Proben zur Auftrennung der filtrierten Überstände der Ansätze A und B, erhalten nach Schritt
20 b) waren dazu wie folgt zusammengesetzt:

Ansatz A (OK1): 43 µl des nach Schritt b) erhaltenen Überstand des Ansatzes A (entspricht ca. 4.000 cpm), 32 µl H₂O, 2,5 µl 2,5 mM Glucose-6-Phosphat und 2,5 µl 5 mM Glucose-3-Phosphat (Σ Volumen = 80 µl).

Ansatz B (R1): 16 µl des nach Schritt b) erhaltenen Überstand des Ansatzes B
25 (entspricht ca. 4.000 cpm), 59 µl H₂O, 2,5 µl 2,5 mM Glucose-6-Phosphat und 2,5 µl 5 mM Glucose-3-Phosphat (Σ Volumen = 80 µl).

Jeweils 60 µl, enthaltend ca. 3.000 cpm, der entsprechenden Proben wurden zur Auftrennung mittels HPAE injiziert. Die Durchführung der HPAE erfolgte nach den unter Punkt 23 c) angegebenen Bedingungen. Die Elutionspuffer wurden nach
30 Passage der HPAE-Säule in Fraktionen von je 1 ml aufgesammelt. Das Aufsammeln

der Fraktionen wurde 10 Minuten nach Injektion der Probe begonnen. Anhand des erhaltenen Signals des eingesetzten PAD Detektors konnte die Elution von Glucose-6-Phosphat der Fraktion 15 und die die Elution von Glucose-3-Phosphat der Fraktion 17 zugeordnet werden. Jeweils 500 µl der einzelnen Fraktionen wurden mit je 3 ml 5 Scintillationscocktail (Ready Safe™, BECKMANN) gemischt und anschließend mit Hilfe eines Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTERTM) vermessen. Für die einzelnen Fraktionen wurden folgende Meßwerte erhalten:

	Gesamt cpm je Fraktion		
	Ansatz (OK1)	AAnsatz (R1)	B
Fr 13	8,7	3,3	
Fr 14	13,1	32,2	
Fr 15 (G6P)	207,3	1952,8	
Fr 16	399,8	112,3	
Fr 17 (G3P)	1749,2	801,6	
Fr 18	196,7	17,3	
Fr 19	6,7	18,9	
Summe	2581,5	2938,3	
Auftrag	3000,0	3000,0	
Wiederfindung	86,0%	97,9%	

10 **Tabelle 4:** Gemessene Menge an Radiaktivität [cpm] in einzelnen Fraktionen von Hydrolyseprodukten, erhalten durch Hydrolyse von mittels eines OK1 Proteins oder R1 Proteins phosphorylierten Stärke.

Die Ergebnisse sind auch in Fig. 5 graphisch dargestellt

Nach von R1 Protein katalysierter Phosphorylierung von Stärke eluierten nach Hydrolyse der Stärke ca. 66% des radioaktiv markierten Phosphates, bezogen auf das gesamte gemessene radioaktive Phosphat in den analysierten Fraktionen, mit der Fraktion, die Glucose-6-Phosphat als Standard enthielt und ca. 27% mit der

5 Fraktion, die Glucose-3-Phosphat als Standard enthielt. Nach von OK1 Protein katalysierter Phosphorylierung von Stärke, eluierten nach Hydrolyse der Stärke ca. 67% des radioaktiv markierten Phosphates, bezogen auf das gesamte gemessene radioaktive Phosphat in den analysierten Fraktionen, mit der Fraktion, die Glucose-3-Phosphat als Standard enthielt und ca. 8% mit der Fraktion, die Glucose-6-Phosphat

10 als Standard enthielt.. Daraus kann geschlossen werden, dass Glucosemoleküle der Stärke von R1 Proteinen bevorzugt in C-6-Position phosphoryliert werden, während von OK1 Proteinen Glucosemoleküle der Stärke bevorzugt in C-3-Position phosphoryliert werden.

15 9. Identifizierung eines OK1 Proteins in Reis

Durch Verwendung der unter den Punkten 1 bis 13, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren konnte auch ein Protein aus *Oryza sativa* (Varietät M202) identifiziert werden, welches einen Phosphatrest von ATP auf P-Stärke überträgt. Das Protein wurde mit O.s.-OK1 bezeichnet. Nicht-phosphorylierte-Stärke wird von

20 dem O.s.-OK1 Protein nicht als Substrat verwendet, d.h. auch das O.s.-OK1 Protein benötigt P-Stärke als Substrat. Die das identifizierte O.s.-OK1 Protein codierende Nucleinsäuresequenz ist unter SEQ ID NO 3 und die das O.s.-OK1 Protein codierende Aminosäuresequenz ist unter SEQ ID NO. 4 dargestellt. Die unter SEQ ID NO 4 dargestellte Aminosäuresequenz codierend das O.s.-OK1 Protein weist eine

25 Identität von 57% mit der unter SEQ ID NO 2 dargestellten Aminosäuresequenz codierend das A.t.-OK1 Protein auf. Die unter SEQ ID NO 3 dargestellte Nucleinsäuresequenz codierend das O.s.-OK1 Protein weist eine Identität von 61% mit der unter SEQ ID NO 1 dargestellten Nucleinsäuresequenz, codierend das A.t.-OK1 Protein auf.

Herstellung des Plasmides pMI50 enthaltend die Nucleinsäuresequenz codierend ein OK1 Protein aus *Oryza sativa*

Der Vektor pMI50 enthält ein DNA-Fragment welches das vollständige OK1 Protein aus Reis der Varietät M202 kodiert.

5 Die Amplifikation der DNA aus Reis erfolgte in fünf Teilschritten.

Der Teil des offenen Leserasters von Position -11 bis Position 288 der unter SEQ DIE NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser Transkriptase und der Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide Os_ok1-R9 (GGAACCGATAATGCCTACATGCTC) und Os_ok1-F6 (AAACTCGAGGAGGATCAATGACGTCGCTGCGGCCCTC) als Primer auf RNA von unreifen Reissamen amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML123 bezeichnet.

15 Der Teil des offenen Leserasters von Position 250 bis Position 949 der unter SEQ DIE NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser Transkriptase und der Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide Os_ok1-F4 (CCAGGTTAAGTTTGGTGAGCA) und Os_ok1-R6 (CAAAGCACGATATCTGACCTGT) als Primer auf RNA von unreifen Reissamen amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML120 bezeichnet.

25 Der Teil des offenen Leserasters von Position 839 bis Position 1761 der unter SEQ DIE NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser Transkriptase und der Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide Os_ok1-F7 (TTGTTTCGCGGGATATTGTCAGA) und Os_ok1-R7 (GACAAGGGCATCAAGAGTAGTATC) als Primer auf RNA von unreifen Reissamen amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML121 bezeichnet.

30 Der Teil des offenen Leserasters von Position 1571 bis Position 3241 der unter SEQ DIE NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser Transkriptase und der

Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide Os_ok1-F8 (ATGATGCGCCTGATAATGCT) und Os_ok1-R4 (GGCAAACAGTATGAAGCACGA) als Primer auf RNA von unreifen Reissamen amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML119 bezeichnet.

Der Teil des offenen Leserasters von Position 2777 bis Position 3621 wurde mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide Os_ok1-F3 (CATTTGGATCAATGGAGGATG) und Os_ok1-R2 (CTATGGCTGTGGCCTGCTTTGCA) als Primer auf genomischer DNA von Reis amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML122 bezeichnet.

Die Zusammenklonierung der Teilstücke des offenen Leserasters von OK1 erfolgte folgendermaßen.

Ein 700 Basenpaare langes *Apal*-Fragment aus pML120, einen Teil des offenen Leserasters von OK1 enthaltend wurde in die *Apal*-Schnittstelle von pML121 kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI47 bezeichnet.

Ein 960 Basenpaare langes Fragment enthaltend die für OK1 codierenden Bereiche der Vektoren aus pML120 und pML123 wurde mittels Polymerase Kettenreaktion amplifiziert. Dabei wurden die Primer Os_ok1-F4 (s. o.) und Os_ok1-R9 (s. o.) je in einer Konzentration von 50 nm und die Primer Os_ok1-F6 und Os_ok1-R6 je in einer Konzentration von 500 nm eingesetzt. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI44 bezeichnet.

Ein 845 Basenpaare langes Fragment aus pML122 wurde zur Einführung einer *XhoI*-Schnittstelle nach dem Stop-Codon mit den Primern Os_ok1-F3 (s. o.) und Os_ok1-R2Xho (AAACTCGAGCTATGGCTGTGGCCTGCTTTGCA) reamplifiziert und in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit t pMI45 bezeichnet.

Ein 1671 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen Leserasters von OK1 wurde aus pML119 durch Verdau mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *PstI* erhalten. Das Fragment wurde in pBluskript II SK+ (Genbank Acc.: X52328) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI46 bezeichnet.

5 Ein 1706 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen Leserasters von OK1 wurde mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *XhoI* aus pMI46 herausgeschnitten und in den Vektor pMI45 kloniert, der mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten worden war. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI47 bezeichnet.

10 Ein 146 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen Leserasters von OK1 wurde mit den Restriktionsenzymen *AflI*/*NotI* aus pMI43 herausgeschnitten und in den Vektor pMI44 kloniert, der mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten worden war. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI49 bezeichnet.

Ein 1657 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen
15 Leserasters von OK1 wurde mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *NarI* aus dem Vektor pMI49 herausgeschnitten und in den Vektor pMI47 kloniert, der mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten worden war. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI50 bezeichnet und enthält die gesamte codierende Region des in Reis identifizierten OK1 Proteins.

20

10. Herstellung eines Antikörpers, der ein OK1 Protein spezifisch erkennt

Als Antigen wurde ca. 100 µg gereinigtes A.t.-OK1 Protein mittels SDS Gelelektrophorese aufgetrennt, die Proteinbande enthaltend das A.t.-OK1 Protein ausgeschnitten und an die Firma EUROGENTEC S.A. (Belgien) verschickt, die die
25 Herstellung des Antikörpers im Auftrag ausführte. Zunächst wurden die Preimmunseren von Kaninchen dahingehend geprüft, ob sie evtl. bereits vor der Immunisierung mit rekombinantem OK1 ein Protein aus einem A. t. Gesamtextrakt erkennen. Die Preimmunseren zweier Kaninchen erkannten im Bereich 100-150 kDa keine Proteine und wurden daraufhin für die Immunisierung ausgewählt. Pro
30 Kaninchen wurden 4 Injektionen à 100 µg Protein durchgeführt (Tag 0, 14, 28, 56).

Je Kaninchen wurden 4 Blutentnahmen durchgeführt: (Tag 38, Tag 66, Tag 87 und die Endblutung). Serum, erhalten nach der ersten Blutung zeigte bereits eine spezifische Reaktion mit OK1 Antigen im Western-Blot. Für alle weiteren Versuche wurde jedoch die letzte Blutung eines Kaninchens verwendet.

5 **11. Herstellung transgener Reispflanzen, die eine verringerte Aktivität eines OK1 Proteins aufweisen**

a) Herstellung eines Konstruktes zur Inhibierung des OK1 Proteins in Reis mittels RNAi Technologie

10 Das Plasmid pML125, welches zur Transformation von Reispflanzen verwendet wurde, wurde durch spezifische Rekombination der Plasmide pML124 und pIR115 unter Verwendung des Gateway™ Klonierungssystems (Invitrogen) erhalten.

15 pML124 wurde erhalten, indem ein 359 Basenpaare langes DNA-Fragment aus pML119 (siehe oben, Beispiel 9), enthaltend einen Teil des offenen Leserasters welcher für das OK1-Protein aus Reis codiert, in den mit *EcoRI* geschnittenen Vektor pENTR-1A (Invitrogen, Produktnummer 11813-011) kloniert wurde.

20 Das Plasmid pIR115 basiert auf den Plasmiden pGSV71, pIR94, enthaltend den Promoter des Globulin-Gens aus Reis, pIR87 enthaltend das Intron 1 des Gens codierend für Alkoholdehydrogenase aus Mais und die „Gateway reading frame cassette A“ (RfA) aus dem „Vector conversion System“ (Invitrogen Produktnummer 11828-019).

25 pGSV71 ist ein Derivat des Plasmides pGSV7, welches sich vom intermediären Vektor pGSV1 ableitet. pGSV1 stellt ein Derivat von pGSC1700 dar, dessen Konstruktion von Cornelissen und Vanderwiele (Nucleic Acid Research 17, (1989), 19-25) beschrieben wurde. pGSV1 wurde aus pGSC1700 erhalten, durch Deletion des Carbenicillin Resistenzgen, sowie Deletion der T-DNA-Sequenzen der TL-DNA-Region des Plasmides pTiB6S3.

30 pGSV7 enthält den Replikationsursprung des Plasmides pBR322 (Bolivar et al., Gene 2, (1977), 95-113) sowie den Replikationsursprung des *Pseudomonas*-Plasmides pVS1 (Itoh et al., Plasmid 11, (1984), 206). pGSV7 enthält außerdem das

selektierbare Markergen *aadA*, aus dem Transposon Tn1331 aus *Klebsiella pneumoniae*, welches Resistenz gegenüber den Antibiotika Spectinomycin und Streptomycin verleiht (Tolmasky, Plasmid 24 (3), (1990), 218-226; Tolmasky and Crosa, Plasmid 29(1), (1993), 31-40)

- 5 Das Plasmid pGSV71 wurde erhalten durch Klonierung eines chimären *bar*-Gens zwischen die Borderregionen von pGSV7. Das chimäre *bar*-Gen enthält die Promotorsequenz des Blumenkohlmosaikvirus zur Initiation der Transkription (Odell et al., Nature 313, (1985), 180), das *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson et al., Embo J. 6, (1987), 2519-2523) und den 3'-untranslatierten Bereich
10 des Nopalinsynthasegens der T-DNA von pTiT37, zur Termination der Transkription und Polyadenylierung. Das *bar*-Gen vermittelt Toleranz gegenüber dem Herbizid Glufosinat-Ammonium.

- Das Plasmid pIR94 wurde erhalten indem der Promoter des Globulin-Gens aus Reis
15 durch eine Polymerase Kettenreaktion (30 x 20 sec 94 °C, 20 sec 62 °C, 1 min 68 °C, 4 mM Mg₂SO₄) mit den Primern glb1-F2 (AAAACAATTGGCGCCTGGAGGGAGGAGA) und glb1-R1 (AAAACAATTGATGATCAATCAGACAATCACTAGAA) auf genomischer DNA von Reis der Varietät M202 mit High Fidelity Taq Polymerase (Invitrogen, Katalognummer 11304-011) amplifiziert und in pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer
20 K2020-20) kloniert wurde.

- Das Plasmid pIR87 wurde erhalten indem das Intron 1 des Gens codierend für Alkoholdehydrogenase aus Mais mit den Primern Adh(i)-1
(TTTTCTCGAGGTCCGCCTTGTTTCTCCT) und Adh(i)-2
(TTTTCTCGAGCTGCACGGGTCCAGGA) auf genomischer DNA von Mais der amplifiziert
25 wurde. Das Produkt der Polymerase Kettenreaktion (30 x 30 sec 94 °C, 30 sec 59 °C, 1 min 72 °C, 2,5 mM MgCl₂) wurde mit dem Restriktionsenzym *Xho*I verdaut und in den Vektor pBluescript II SK+ (Genbank # X52328) kloniert, der mit dem gleichen Enzym geschnitten worden war.

- Das Plasmid pIR115 wurde erhalten indem eine synthetisches Stück DNA bestehend
30 aus den beiden Oligonukleotiden X1
(TGCAGGCTGCAGAGCTCCTAGGCTCGAGTTAACTAGTAAGCTTAATTAAGAT

ATCATTAC)

und

X2

(AATTGTAAATGATATCTTAATTAAGCTTACTAGTGTTAACTCGAGCCTAGGAGCTCTGCAGCCTGCA) in den mit *SdaI* und *MunI* geschnittenen Vektor pGSV71 kloniert wurde.

- 5 Das erhaltene Plasmid pIR115 wurde mit *SdaI* geschnitten, die überstehenden 3'-Enden mit T4 DNA Polymerase geglättet und ein 197 Basenpaare großes, mittels T4 DNA-Polymerase geglättetes *HindIII* / *SphI* Fragment aus pBinAR (Höfgen und Willmitzer, 1990, Plant Science 66, 221-230), enthaltend das Terminationssignal des Octopinsynthese Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*, eingefügt. Das erhaltene
- 10 Plasmid wurde mit pIR96 bezeichnet. In den Vektor pIR96 wurde ein 986 Basenpaare langes DNA Fragment aus pIR94, enthaltend den Promoter des Globulin-Gens aus Reis, kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pIR103 bezeichnet.

- Das Plasmid pIR107 wurde erhalten indem die „RfA-Kassette“ (s. o.) in das mit dem
- 15 Restriktionsenzym *EcoRV* geschnittene Plasmid pIR103 kloniert wurde.

- Aus dem Plasmid pIR87 wurde mit dem Restriktionsenzym *XhoI* ein 540 Basenpaare langes Fragment enthaltend das Intron 1 des Gens codierend für Alkoholdehydrogenase aus Mais herausgeschnitten und in den ebenfalls mit *XhoI* geschnittene Plasmid pIR107 kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pIR114
- 20 bezeichnet. Das Plasmid pIR115 wurde erhalten indem die „RfA-Kassette“ (s. o.) in das mit *EcoRV* geschnittene Plasmid pIR114 kloniert wurde. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML125 bezeichnet.

b) Transformation von Reispflanzen

- 25 Reispflanzen (Varietät M202) wurden mittels *Agrobacterium* (enthaltend das Plasmid pML125) unter Verwendung der bei Hiei et al. (1994, Plant Journal 6(2), 271-282) beschriebenen Methode transformiert.

c) Analyse der transgenen Reispflanzen

Mit Hilfe der Quantitativer RT PCR Analyse konnten Reispflanzen identifiziert werden, die eine verringerte Menge an OK1 Protein codierender mRNA aufwiesen.

12. Herstellung transgener Kartoffelpflanzen, die eine verringerte Aktivität eines OK1 Proteins aufweisen

a) Herstellung des Plasmides pBinB33-Hyg

Ausgehend vom Plasmid pBinB33 wurde das EcoRI-HindIII-Fragment umfassend den B33-Promotor, einen Teil des Polylinkers sowie den ocs-Terminator herausgeschnitten und in den entsprechend geschnittenen Vektor pBIB-Hyg ligiert (Becker, 1990, Nucl. Acids Res. 18, 203).

Das Plasmid pBinB33 wurde erhalten, indem der Promotor des Patatin Gens B33 aus *Solanum tuberosum* (Rocha-Sosa et al., 1989) als *DraI*-Fragment (Nukleotide - 1512 - +14) in den mit *SstI* geschnittenen Vektor pUC19, dessen Enden mit Hilfe der T4 DNA-Polymerase geglättet worden waren, ligiert wurde. Daraus entstand das Plasmid pUC19-B33. Aus diesem Plasmid wurde der B33-Promotor mit EcoRI und *SmaI* herausgeschnitten und in den entsprechend geschnittenen Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, 1990, Plant Science 66, 221-230) ligiert. Hieraus entstand der pflanzliche Expressionsvektor pBinB33.

b) Herstellung des Vektors A.t.-OK1-pBinB33-Hyg

Die codierende Sequenz des A.t.-OK1 Proteins wurde mit den Restriktionsendonucleasen *Bsp120I* und *Sall* aus dem Plasmid OK1-pGEM herausgeschnitten und in den mit *SmaI* und *Sall* geschnittenen Vektor pBinB33-Hyg ligiert. Das erhaltene Plasmid wurde mit A.t.-OK1-pBinB33-Hyg bezeichnet.

c) Transformation von Kartoffelpflanzen

Agrobacterium tumefaciens (Stamm GV2260) wurde mit dem Plasmid A.t.-OK1-pBinB33-Hyg transformiert. Anschließend wurden Kartoffelpflanzen der Varietät Désirée mit Hilfe der Agrobakterien, enthaltend das Plasmid A.t.-OK1-pBinB33-Hyg

nach der bei Rocha-Sosa et al. (EMBO J. 8, (1989), 23-29) beschriebenen Methode transformiert und Pflanzen regeneriert.

d) Analyse der transgenen Kartoffelpflanzen und der von diesen synthetisierten

5 Stärke

Es konnten mittels Quantitativer RT PCR Analyse Pflanzen identifiziert werden, die eine verringerte Aktivität des endogenen OK1 Proteins in den Knollen aufwiesen.

Eine Western Blot Analyse, welche mit dem unter Beispiel 10 beschriebenen Antikörper durchgeführt wurde, bestätigte, dass Pflanzen, die eine verringerte Menge
10 an mRNA des endogenen OK1 Proteins aufwiesen, auch eine verringerte Menge an OK1 Protein aufwiesen, im Vergleich zu nicht transformierten Wildtyp-Pflanzen.

Pflanzen, die im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp Pflanzen eine verringerte Menge an OK1 Protein und eine verringerte Menge an OK1 Protein codierender mRNA aufwiesen, wurden erneut im Gewächshaus angezogen. Stärke, die aus
15 Konollen dieser Pflanzen isoliert wurde, zeigte einen verringerten Gehalt an kovalent an die betreffende Stärke gebundenem Phosphaat.

13. Analyse von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen, die eine verringerte Aktivität eines OK1 Proteins aufweisen

20 T-DNA Insertionsmutanten von *Arabidopsis thaliana* (erhältlich von Salk Institute Genomic Analysis Laboratory, 10010 N. Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, <http://signal.salk.edu/> unter den ACC. No.: Salk_110814, Alias N610814), die bezüglich der Insertion im OK1 Gen homozygot waren, wurden unter folgenden Bedingungen angezogen:

25 Lichtphase: 16 Stunden, 20°C

Dunkelphase: 8 Stunden, 16°C

Kurz bevor die Blütenbildung einsetzte, wurden die Pflanzen bei einer Lichtphase von 12 Stunden bei 20°C und einer Dunkelphase von 12 Stunden bei 17°C kultiviert.

Von den erhaltenen Samen der Mutantenlinie (Salk_110814) wurden Pflanzen aus 3 verschiedenen Samen des ursprünglichen Saatgutes (Salk_110814-1, Salk_110814-2, Salk_110814-3) für die Analyse kultiviert.

Am Ende der Dunkelphase wurden von 6 Wildtyp-Pflanzen (Ökotyp Columbia) jeweils 10 Blätter entfernt und in 70% Ethanol bei 50°C entfärbt. Weiterhin wurden von jeweils 4 verschiedenen Pflanzen der Mutantenlinien Salk_110814-1, Salk_110814-2 bzw. Salk_110814-3 die jeweils homozygot bezüglich der T-DNA Insertion in einem OK1 Gen waren, jeweils 6 Blätter entfernt und in 70% Ethanol bei 50°C entfärbt. Anschließend wurden die Blätter für 10 Minuten in Lugol'scher Lösung inkubiert, bevor überschüssige Lugol'sche Lösung mit Leitungswasser von den Blättern abgespült wurde. Alle Blätter von Wildtyp-Pflanzen zeigten keine Färbung mit Lugol'scher Lösung. Alle Blätter der Mutantenlinien Salk_110814-1, Salk_110814-2 bzw. Salk_110814-3 zeigten hingegen eine dunkelbraune oder eine schwarze Färbung. Die Mutantenlinien zeigen daher einen Hoch-Stärke Phänotyp im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen. Während der Kultivierung konnten keine Unterschiede betreffend das Wachstum zwischen den Mutantenlinien und den Wildtyp-Pflanzen festgestellt werden.

Genetisch modifizierte *Arabidopsis thaliana* Pflanzen, welche mit einem RNAi Konstrukt, enthaltend „inverted Repeats“ der codierenden Region eines OK1 Gens unter Kontrolle des 35S Promotors, transformiert waren, wurden mit Hilfe der Western Blot Analyse unter Verwendung des in Beispiel 10 beschriebenen Antikörpers analysiert. Es konnten mehrere unabhängige Linien identifiziert werden, die eine verringerte Menge an OK1 Protein aufwiesen, im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen. Diese Linien wurden unter den im Beispiel 13 angegebenen Kulturbedingungen kultiviert. Jeweils 5 Blätter der einzelnen Linien wurden am Ende der Dunkelphase (12 Stunden bei 17°C) entfernt, in Ethanol entfärbt und mit Lugol'scher Lösung gefärbt. Alle Pflanzen zeigten im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Pflanzen einen Hoch-Stärke Phänotyp. Während der Kultivierung konnten keine Unterschiede betreffend das Wachstum zwischen den genetisch modifizierten Pflanzen und den Wildtyp-Pflanzen festgestellt werden. Die mittels RNAi Technologie genetisch modifizierten Pflanzen zeigten damit die gleichen Eigenschaften wie die Mutantenlinien Salk_110814-1, Salk_110814-2 bzw. Salk_110814-3.

Patentansprüche

2 9 -03- 2004

1. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine verringerte Aktivität mindestens eines OK1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen aufweist.
2. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 1, wobei die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls in das Genom der Pflanzenzelle besteht.
3. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 2, wobei das fremde Nucleinsäuremolekül Aminosäuresequenzen codiert, die von einer ein OK1 Protein codierenden Aminosäuresequenz umfasst sind.
4. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 2 oder 3, wobei besagtes fremdes Nucleinsäuremolekül ausgewählt ist, aus der Gruppe bestehend aus
 - a) DNA-Molekülen, die mindestens eine antisense-RNA codieren, welche eine Verringerung der Expression von mindestens einem endogenen Gen bewirkt, das ein OK1 Protein codiert;
 - b) DNA-Molekülen, die über einen Cosuppressionseffekt zu Verringerung der Expression von mindestens einem endogenen Gen führen, das ein OK1 Protein codiert;
 - c) DNA-Molekülen, die mindestens ein Ribozym codieren, das spezifisch Transkripte von mindestens einem endogenen Gen spaltet, das ein OK1 Protein codiert,
 - d) DNA-Molekülen, die simultan mindestens eine antisense-RNA und mindestens eine sense-RNA codieren, wobei besagte antisense-RNA und besagte sense-RNA ein doppelsträngiges RNA-Molekül ausbilden, das eine Verringerung der Expression von mindestens einem endogenen Gen bewirkt, das ein OK1 Protein codiert (RNAi Technologie);
 - e) Mittels in vivo-Mutagenese eingeführte Nucleinsäuremoleküle, die zu einer Mutation oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in mindestens einem endogenen OK1 Protein codierenden Gen führen, wobei die

Mutation oder Insertion eine Verringerung der Expression eines OK1 Protein codierenden Gens bewirkt, oder die Synthese von inaktiven OK1 Protein zur Folge hat;

- f) Nucleinsäuremolekülen, die einen Antikörper codieren, wobei der Antikörper durch die Bindung an ein OK1 Protein eine Verringerung der Aktivität eines OK1 Proteins zur Folge hat,
 - g) DNA Molekülen, die Transposons enthalten, wobei die Integration dieser Transposons zu einer Mutation oder einer Insertion in mindestens einem endogenen OK1 Protein codierenden Gen führt, welches eine Verringerung der Expression von mindestens einem ein OK1 Protein codierenden Gens bewirkt, oder die Synthese von inaktiven OK1 Protein zur Folge hat; und/oder
 - h) T-DNA Molekülen, die durch Insertion in mindestens einem endogenen OK1 Protein codierenden Gen eine Verringerung der Expression von mindestens OK1 Protein codierenden Gen bewirken, oder die Synthese von inaktivem OK1 Protein zur Folge haben.
5. Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 4, die im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen eine modifizierte Stärke synthetisiert.
 6. Pflanze enthaltend Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 5.
 7. Pflanze nach Anspruch 6, die eine Stärke speichernde Pflanze ist.
 8. Pflanze nach Anspruch 7, die eine Weizen- oder Maispflanze ist.
 9. Pflanze nach einem der Ansprüche 6, 7 oder 8, die einen Hoch-Stärke (starch excess) Phänotyp aufweist.
 10. Vermehrungsmaterial von Pflanzen nach einem der Ansprüche 6 bis 9, enthaltend Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 5.
 11. Erntebare Pflanzenteile von Pflanzen nach einem der Ansprüche 6 bis 9, enthaltend Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 5.

12. Verfahren zur Herstellung einer genetisch modifizierten Pflanze nach einem der Ansprüche 6 bis 9, worin
 - a) eine Pflanzenzelle genetisch modifiziert wird, wobei die genetische Modifikation zur Verringerung der Aktivität eines OK1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen führt;
 - b) aus Pflanzenzellen von Schritt a) eine Pflanze regeneriert wird; und
 - c) gegebenenfalls weitere Pflanzen mit Hilfe der Pflanzen nach Schritt b) erzeugt werden.
13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls in das Genom der Pflanze besteht.
14. Verfahren nach Anspruch 13, worin besagtes fremde Nukleinsäuremolekül ausgewählt ist, aus der Gruppe bestehend aus
 - a) DNA-Molekülen, die mindestens eine antisense-RNA codieren, welche eine Verringerung der Expression von mindestens einem endogenen Gen bewirkt, das ein OK1 Protein codiert;
 - b) DNA-Molekülen, die über einen Cosuppressionseffekt zu Verringerung der Expression von mindestens einem endogenen Gen führen, das ein OK1 Protein codiert;
 - c) DNA-Molekülen, die mindestens ein Ribozym codieren, das spezifisch Transkripte von mindestens einem endogenen Gen spaltet, das ein OK1 Protein codiert,
 - d) DNA-Molekülen, die simultan mindestens eine antisense-RNA und mindestens eine sense-RNA codieren, wobei besagte antisense-RNA und besagte sense-RNA ein doppelsträngiges RNA-Molekül ausbilden, das eine Verringerung der Expression von mindestens einem endogenen Gen bewirkt, das ein OK1 Protein codiert (RNAi Technologie);
 - e) Mittels in vivo-Mutagenese eingeführte Nucleinsäuremoleküle, die zu einer Mutation oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in mindestens einem endogenen OK1 Protein Gen führen, wobei die Mutation oder

Insertion eine Verringerung der Expression eines OK1 Protein codierenden Gens bewirkt, oder die Synthese von inaktivem OK1 Protein zur Folge hat;

- f) Nucleinsäuremolekülen, die einen Antikörper codieren, wobei der Antikörper durch die Bindung an ein OK1 Protein eine Verringerung der Aktivität eines OK1 Protein zur Folge hat,
 - g) DNA Molekülen, die Transposons enthalten, wobei die Integration dieser Transposons zu einer Mutation oder einer Insertion in mindestens einem endogenen OK1 Protein codierenden Gen führt, welches eine Verringerung der Expression von mindestens einem ein OK1 Protein codierenden Gens bewirkt, oder die Synthese von inaktiven OK1 Protein zur Folge hat; und/oder
 - h) T-DNA Molekülen, die durch Insertion in mindestens einem endogenen OK1 Protein codierenden Gen eine Verringerung der Expression von mindestens einem OK1 Protein codierenden Gen bewirken, oder die Synthese von inaktivem OK1 Protein zur Folge haben.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12, 13 oder 14, wobei die genetisch modifizierte Pflanze im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen eine modifizierte Stärke synthetisiert.
16. Rekombinantes Nucleinsäuremolekül enthaltend einen Promotor, der in Pflanzenzellen die Initiation der Transkription bewirkt und mindestens eine Nucleinsäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe aus
- a) Nucleinsäuresequenzen, die mindestens eine antisense-RNA codieren, welche eine Verringerung der Expression von mindestens einem endogenen Gen bewirkt, das ein OK1 Protein codiert;
 - b) Nucleinsäuresequenzen, die über einen Cosuppressionseffekt zu Verringerung der Expression von mindestens einem endogenen Gen führen, das ein OK1 Protein codiert;
 - c) Nucleinsäuresequenzen, die mindestens ein Ribozym codieren, das spezifisch Transkripte von mindestens einem endogenen Gen spaltet, das ein OK1 Protein codiert und

- d) Nucleinsäuresequenzen, die simultan mindestens eine antisense-RNA und mindestens eine sense-RNA codieren, wobei besagte antisense-RNA und besagte sense-RNA ein doppelsträngiges RNA-Molekül ausbilden, das eine Verringerung der Expression von mindestens einem endogenen Gen bewirkt, das ein OK1 Protein codiert (RNAi Technologie).
17. Vektor enthaltend ein rekombinantes Nucleinsäuremolekül wie in Anspruch 16 unter a) bis d) definiert.
 18. Wirtszelle, die genetisch modifiziert ist mit einem rekombinanten Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 16 oder mit einem Vektor nach Anspruch 17.
 19. Zusammensetzung enthaltend ein rekombinantes Nucleinsäuremolekül wie in Anspruch 16 unter a) bis d) definiert oder einen Vektor nach Anspruch 17.
 20. Modifizierte Stärke erhältlich aus einer genetisch modifizierten Pflanze nach einem der Ansprüche 6 bis 9, aus Vermehrungsmaterial nach Anspruch 10, oder aus erntebaren Pflanzenteilen nach Anspruch 11.
 21. Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus einer Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 5.
 22. Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus einer Pflanze nach einem der Ansprüche 6 bis 9, und/oder aus Stärke speichernden Teilen einer solchen Pflanze.
 23. Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus erntebaren Pflanzenteilen nach Anspruch 11.
 24. Verwendung von Pflanzen nach einem der Ansprüche 6 bis 9 zur Herstellung einer modifizierten Stärke.
 25. Modifizierte Stärke erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 21, 22 oder 23.

26. Verfahren zur Herstellung einer derivatisierten Stärke, worin modifizierte Stärke nach Anspruch 20 oder 25 oder erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 21, 22 oder 23 derivatisiert wird.
27. Derivatisierte Stärke erhältlich nach einem Verfahren nach Anspruch 26.
28. Verwendung von modifizierter Stärke nach einem der Ansprüche 20 oder 25 zur Herstellung von derivatisierter Stärke.

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Pflanzenzellen und Pflanzen, die genetisch modifiziert sind, wobei die genetische Modifikation zur Verringerung der Aktivität eines Stärke phosphorylierenden OK1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen führt. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Mittel und Verfahren zur Herstellung solcher Pflanzenzellen und Pflanzen. Derartige Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren eine modifizierte Stärke. Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch die von den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisierte Stärke, Verfahren zur Herstellung dieser Stärke, sowie die Herstellung von Stärkederivaten dieser modifizierten Stärke, als auch Mehle, enthaltend erfindungsgemäße Stärken. Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung Nucleinsäuremoleküle, die zur Herstellung erfindungsgemäßer Pflanzen geeignet sind.

1 / 5

EPO-BERLIN

29-03-2004

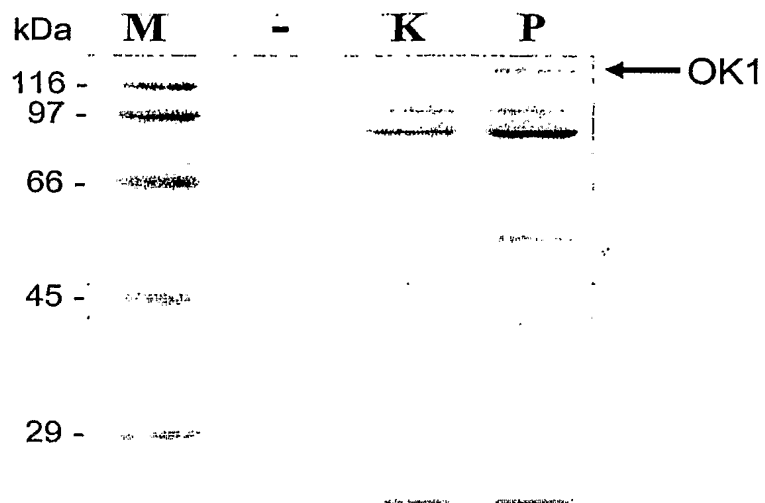


Fig. 1

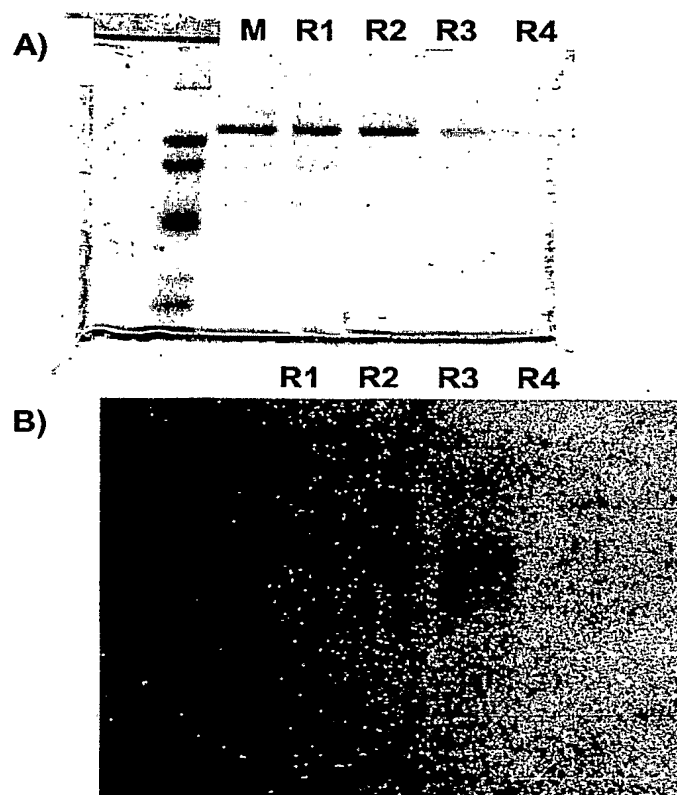


Fig. 2

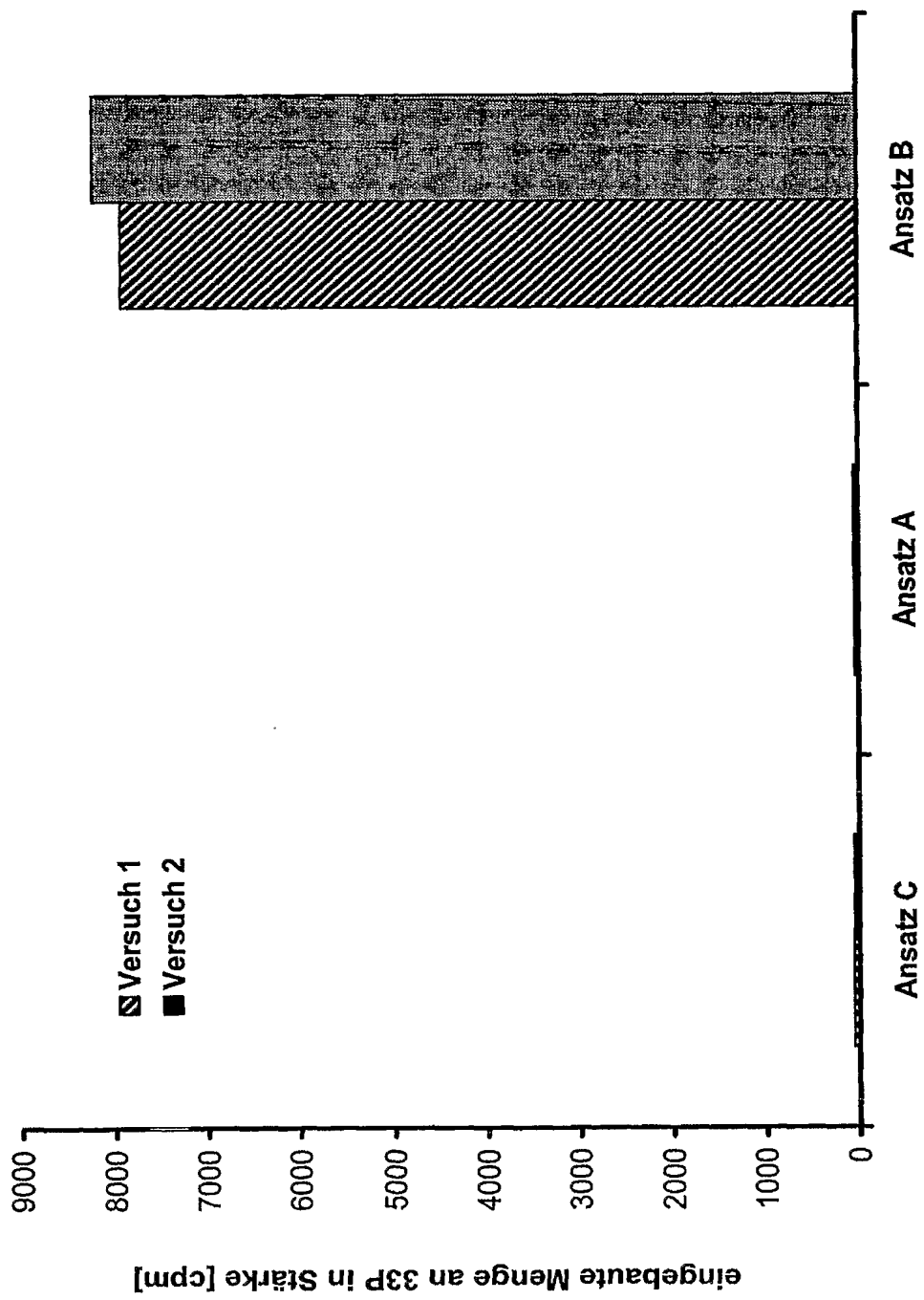


Fig.: 3

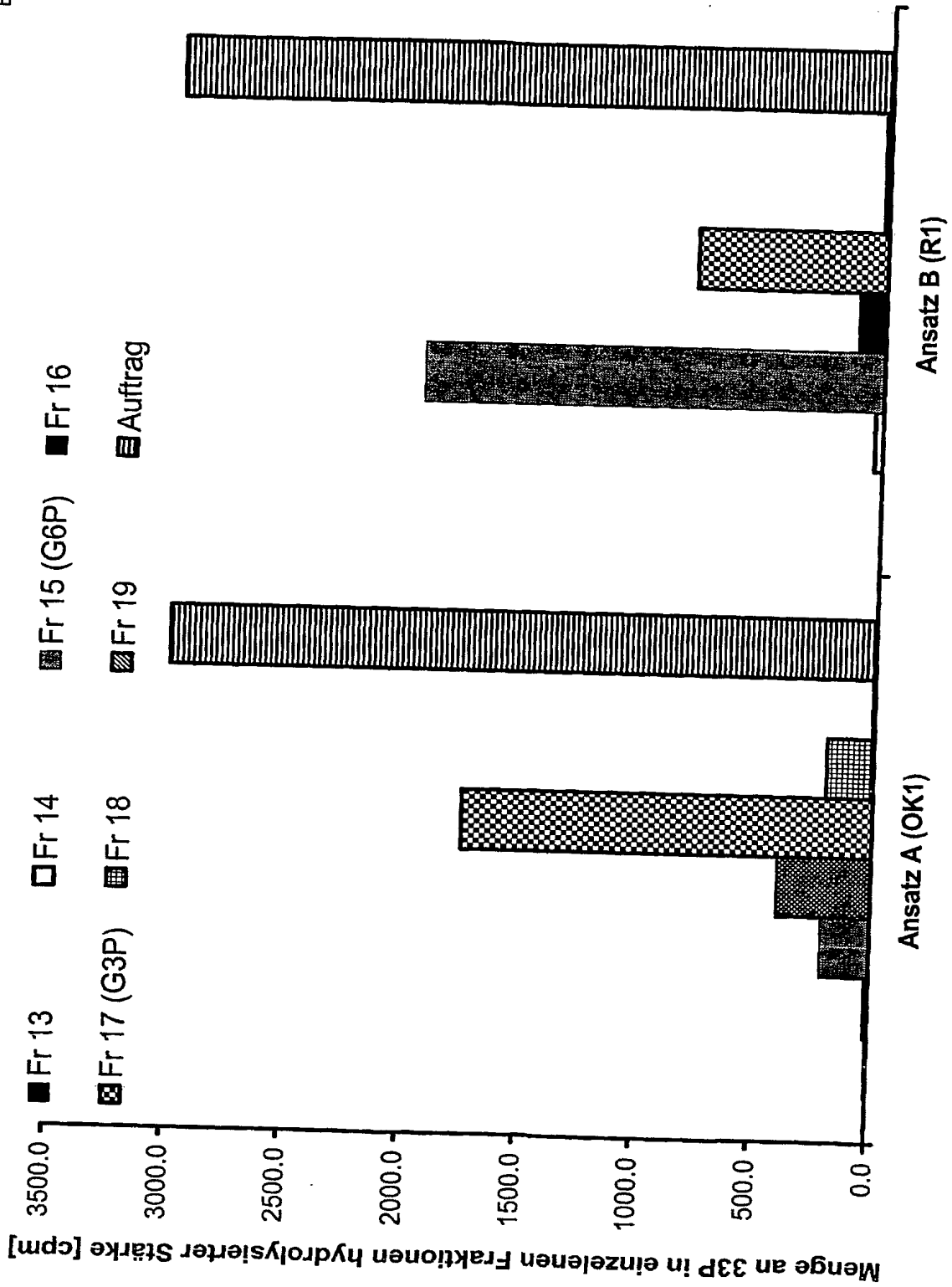


Fig. 4

4 / 5

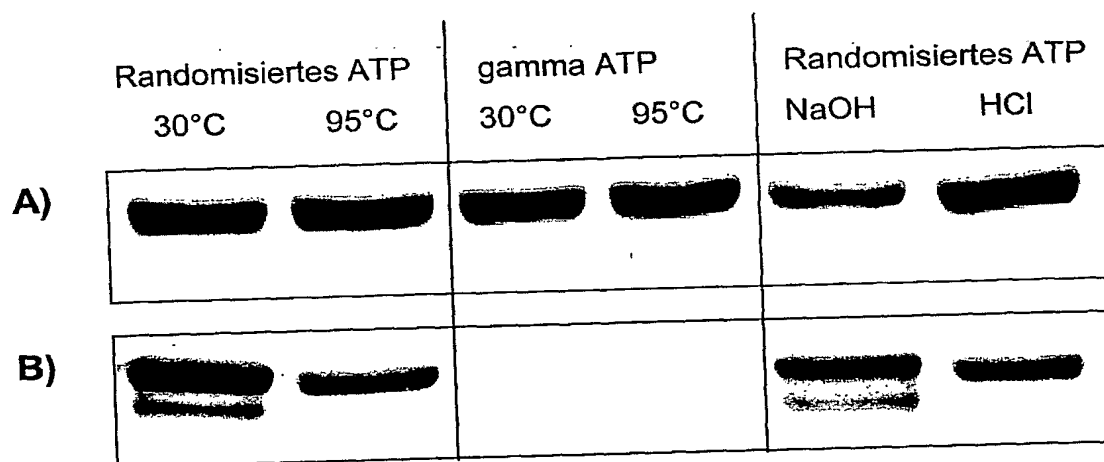


Fig. 5

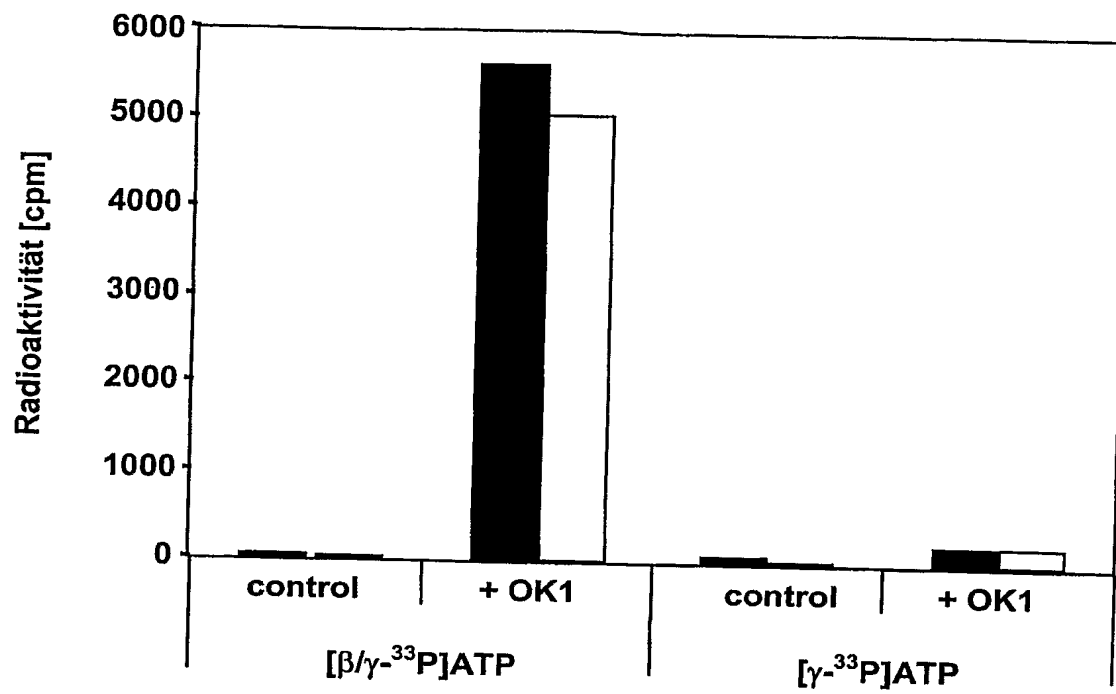


Fig. 6

29-03-2004

BCS 04-5006_OK1 Verringerte Aktivität_SEQUENZPROTOKOLL.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> Bayer CropScience GmbH

<120> Pflanzen mit verringerter Aktivität eines Stärke phosphorylierenden Enzyms

<130> BCS 04-5006-EP

<160> 11

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 3591

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3591)

<223>

<400> 1

atg gag agc att ggc agc cat tgt tgc agc tct cct ttc acc ttc atc	48
Met Glu Ser Ile Gly Ser His Cys Cys Ser Ser Pro Phe Thr Phe Ile	
1 5 10 15	
act aga aac tca tca tca tca ctt cct aga ctc gtt aac atc act cac	96
Thr Arg Asn Ser Ser Ser Ser Leu Pro Arg Leu Val Asn Ile Thr His	
20 25 30	
aga gtt aat ctc agc cac caa tct cac cga ctc aga aac tcc aat tct	144
Arg Val Asn Leu Ser His Gln Ser His Arg Leu Arg Asn Ser Asn Ser	
35 40 45	
cgt ctc act tgc act gct act tct tct tcc acc att gag gaa caa cgg	192
Arg Leu Thr Cys Thr Ala Thr Ser Ser Ser Thr Ile Glu Glu Gln Arg	
50 55 60	
aag aag aaa gat gga tca gga acg aaa gtg agg ttg aat gtg agg tta	240
Lys Lys Lys Asp Gly Ser Gly Thr Lys Val Arg Leu Asn Val Arg Leu	
65 70 75 80	
gat cat caa gtt aat ttt ggt gac cat gtg gct atg ttt gga tca gct	288
Asp His Gln Val Asn Phe Gly Asp His Val Ala Met Phe Gly Ser Ala	

aaa gag att ggt tca tgg aaa aag aaa tcg cct ttg aat tgg agt gag Lys Glu Ile Gly Ser Trp Lys Lys Lys Ser Pro Leu Asn Trp Ser Glu 100 105 110	336
aat gga tgg gtt tgt gag ttg gaa ctt gac ggt ggt cag gtt ttg gag Asn Gly Trp Val Cys Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gly Gln Val Leu Glu 115 120 125	384
tat aag ttt gtc att gtt aag aat gat ggt tca ctt tca tgg gaa tct Tyr Lys Phe Val Ile Val Lys Asn Asp Gly Ser Leu Ser Trp Glu Ser 130 135 140	432
ggt gat aat cgt gtc ctt aag gtt cca aat tct ggg aat ttt tct gtt Gly Asp Asn Arg Val Leu Lys Val Pro Asn Ser Gly Asn Phe Ser Val 145 150 155 160	480
ggt tgt cat tgg gat gct act aga gaa acc ctt gat ttg cct cag gag Val Cys His Trp Asp Ala Thr Arg Glu Thr Leu Asp Leu Pro Gln Glu 165 170 175	528
ggt ggt aat gat gat gat gtt ggt gat ggt ggg cat gag agg gat aat Val Gly Asn Asp Asp Asp Val Gly Asp Gly Gly His Glu Arg Asp Asn 180 185 190	576
cat gat gtt ggt gat gat aga gta gtg gga agt gaa aat ggt gcg cag His Asp Val Gly Asp Asp Arg Val Val Gly Ser Glu Asn Gly Ala Gln 195 200 205	624
ctt cag aag agt aca ttg ggt ggg caa tgg caa ggt aaa gat gcg tcc Leu Gln Lys Ser Thr Leu Gly Gly Gln Trp Gln Gly Lys Asp Ala Ser 210 215 220	672
ttt atg cgt tct aat gat cat ggt aac aga gaa gtt ggt aga aat tgg Phe Met Arg Ser Asn Asp His Gly Asn Arg Glu Val Gly Arg Asn Trp 225 230 235 240	720
gat act agt ggt ctt gaa ggc aca gct ctt aag atg gtt gag ggt gat Asp Thr Ser Gly Leu Glu Gly Thr Ala Leu Lys Met Val Glu Gly Asp 245 250 255	768
cgc aac tct aag aac tgg tgg aga aag ctt gaa atg gta cgc gag gtt Arg Asn Ser Lys Asn Trp Trp Arg Lys Leu Glu Met Val Arg Glu Val 260 265 270	816
ata gtt ggg agt gtt gag agg gag gaa cga ttg aag gcg ctc ata tac Ile Val Gly Ser Val Glu Arg Glu Glu Arg Leu Lys Ala Leu Ile Tyr 275 280 285	864
tct gca att tat ttg aag tgg ata aac aca ggt cag att cct tgt ttt Ser Ala Ile Tyr Leu Lys Trp Ile Asn Thr Gly Gln Ile Pro Cys Phe 290 295 300	912
gaa gat gga ggg cat cac cgt cca aac agg cat gcc gag att tcc aga Glu Asp Gly Gly His His Arg Pro Asn Arg His Ala Glu Ile Ser Arg 305 310 315 320	960
ctt ata ttc cgt gag ttg gag cac att tgc agt aag aaa gat gct act Leu Ile Phe Arg Glu Leu Glu His Ile Cys Ser Lys Lys Asp Ala Thr 325 330 335	1008
cca gag gaa gtg ctt gtt gct cgg aaa atc cat ccg tgt tta cct tct Pro Glu Glu Val Leu Val Ala Arg Lys Ile His Pro Cys Leu Pro Ser 340 345 350	1056
ttc aaa gca gag ttt act gca gct gtc cct cta act cgg att agg gac Phe Lys Ala Glu Phe Thr Ala Ala Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg Asp 355 360 365 370	1104

BCS 04-5006_OK1 Verringerte Aktivität_SEQUENZPROTOKOLL.ST25
 355 360 365

ata gcc cat cgg aat gat att cct cat gat ctc aag caa gaa atc aag Ile Ala His Arg Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile Lys 370 375 380	1152
cat acg ata caa aat aag ctt cac cgg aat gct ggt cca gaa gat cta His Thr Ile Gln Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp Leu 385 390 395 400	1200
att gca aca gaa gca atg ctt caa cga att acc gag acc cca gga aaa Ile Ala Thr Glu Ala Met Leu Gln Arg Ile Thr Glu Thr Pro Gly Lys 405 410 415	1248
tat agt gga gac ttt gtg gag cag ttt aaa ata ttc cat aat gag ctt Tyr Ser Gly Asp Phe Val Glu Gln Phe Lys Ile Phe His Asn Glu Leu 420 425 430	1296
aaa gat ttc ttt aat gct gga agt ctc act gaa cag ctt gat tct atg Lys Asp Phe Phe Asn Ala Gly Ser Leu Thr Glu Gln Leu Asp Ser Met 435 440 445	1344
aaa att tct atg gat gat aga ggt ctt tct gcg ctc aat ttg ttt ttt Lys Ile Ser Met Asp Asp Arg Gly Leu Ser Ala Leu Asn Leu Phe Phe 450 455 460	1392
gaa tgt aaa aag cgc ctt gac aca tca gga gaa tca agc aat gtt ttg Glu Cys Lys Lys Arg Leu Asp Thr Ser Gly Glu Ser Ser Asn Val Leu 465 470 475 480	1440
gag ttg att aaa acc atg cat tct cta gct tct tta aga gaa aca att Glu Leu Ile Lys Thr Met His Ser Leu Ala Ser Leu Arg Glu Thr Ile 485 490 495	1488
ata aag gaa ctt aat agc ggc ttg cga aat gat gct cct gat act gcc Ile Lys Glu Leu Asn Ser Gly Leu Arg Asn Asp Ala Pro Asp Thr Ala 500 505 510	1536
att gca atg cgc cag aag tgg cgc ctt tgt gag atc ggc ctc gag gac Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile Gly Leu Glu Asp 515 520 525	1584
tac ttt ttt gtt cta cta agc aga ttc ctc aat gct ctt gaa act atg Tyr Phe Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Leu Asn Ala Leu Glu Thr Met 530 535 540	1632
gga gga gct gat caa ctg gca aaa gat gtg gga tca aga aac gtt gcc Gly Gly Ala Asp Gln Leu Ala Lys Asp Val Gly Ser Arg Asn Val Ala 545 550 555 560	1680
tca tgg aat gat cca cta gat gct ttg gtg ttg ggt gtt cac caa gta Ser Trp Asn Asp Pro Leu Asp Ala Leu Val Leu Gly Val His Gln Val 565 570 575	1728
ggt cta tct ggt tgg aag caa gaa gaa tgt tta gcc att gga aat gaa Gly Leu Ser Gly Trp Lys Gln Glu Glu Cys Leu Ala Ile Gly Asn Glu 580 585 590	1776
ctc ctt gct tgg cga gaa agg gac cta ctt gaa aaa gaa ggg gaa gag Leu Leu Ala Trp Arg Glu Arg Asp Leu Leu Glu Lys Glu Gly Glu Glu 595 600 605	1824
gat gga aaa aca att tgg gcc atg agg ctg aaa gca act ctt gat cga Asp Gly Lys Thr Ile Trp Ala Met Arg Leu Lys Ala Thr Leu Asp Arg 610 615 620	1872
gca cgc aga tta aca gca gaa tat tct gat ttg ctt ctt caa ata ttt Ala Arg Arg Leu Thr Ala Glu Tyr Ser Asp Leu Leu Leu Gln Ile Phe 625 630 635	1920

BCS 04-5006_OK1 Verringerte Aktivität_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

625	630										635	640										
cct Pro	cct Pro	aat Asn	gtg Val	gag Glu 645	att Ile	tta Leu	gga Gly	aaa Lys	gct Ala 650	cta Leu	gga Gly	att Ile	cca Pro	gag Glu 655	aat Asn							1968
agt Ser	gtc Val	aag Lys	acc Thr 660	tat Tyr	aca Thr	gaa Glu	gca Ala	gag Glu 665	att Ile	cgt Arg	gct Ala	gga Gly 670	att Ile	att Ile	ttc Phe							2016
cag Gln	atc Ile	tca Ser 675	aag Lys	ctc Leu	tgc Cys	act Thr	gtt Val 680	ctt Leu	cta Leu	aaa Lys	gct Ala	gta Val 685	aga Arg	aat Asn	tca Ser							2064
ctt Leu	ggc Gly 690	tct Ser	gag Glu	ggc Gly	tgg Trp	gat Asp 695	gtc Val	gtt Val	gta Val	cct Pro	gga Gly 700	tcg Ser	acg Thr	tct Ser	ggg Gly							2112
aca Thr 705	tta Leu	gtt Val	cag Gln	gtt Val	gag Glu 710	agc Ser	att Ile	gtt Val	ccg Pro	gga Gly 715	tca Ser	ttg Leu	cca Pro	gca Ala	act Thr 720							2160
tct Ser	ggc Gly	ggc Gly	cct Pro	att Ile 725	att Ile	ctc Leu	ttg Leu	gtc Val	aat Asn 730	aaa Lys	gct Ala	gat Asp	ggc Gly	gat Asp 735	gaa Glu							2208
gag Glu	gta Val	agt Ser	gct Ala 740	gct Ala	aat Asn	ggg Gly	aac Asn	ata Ile 745	gct Ala	gga Gly	gtc Val	atg Met	ctt Leu 750	ctg Leu	cag Gln							2256
gag Glu	ctg Leu	cct Pro 755	cac His	ttg Leu	tct Ser	cac His	ctt Leu 760	ggc Gly	gtt Val	aga Arg	gcg Ala	cgg Arg 765	cag Gln	gag Glu	aaa Lys							2304
att Ile	gtc Val 770	ttt Phe	gtg Val	aca Thr	tgt Cys	gat Asp 775	gat Asp	gat Asp	gac Asp	aag Lys	gtt Val 780	gct Ala	gat Asp	ata Ile	cga Arg							2352
cga Arg 785	ctt Leu	gtg Val	gga Gly	aaa Lys	ttt Phe 790	gtg Val	agg Arg	ttg Leu	gaa Glu 795	gca Ala	tct Ser	cca Pro	agt Ser	cat His	gtg Val 800							2400
aat Asn	ctg Leu	ata Ile	ctt Leu	tca Ser 805	act Thr	gag Glu	ggc Gly	agg Arg	agt Ser 810	cgc Arg	act Thr	tcc Ser	aaa Lys	tcc Ser 815	agt Ser							2448
gcg Ala	acc Thr	aaa Lys	aaa Lys 820	acg Thr	gat Asp	aag Lys	aac Asn	agc Ser 825	tta Leu	tct Ser	aag Lys	aaa Lys 830	aaa Lys	aca Thr	gat Asp							2496
aag Lys	aag Lys	agc Ser 835	tta Leu	tct Ser	atc Ile	gat Asp	gat Asp 840	gaa Glu	gaa Glu	tca Ser	aag Lys	cct Pro 845	ggc Gly	tcc Ser	tca Ser							2544
tct Ser	tcc Ser 850	aat Asn	agc Ser	ctc Leu	ctt Leu	tac Tyr 855	tct Ser	tcc Ser	aag Lys	gat Asp	atc Ile 860	cct Pro	agt Ser	gga Gly	gga Gly							2592
atc Ile 865	ata Ile	gca Ala	ctt Leu	gct Ala	gat Asp 870	gca Ala	gat Asp	gta Val	cca Pro	act Thr 875	tct Ser	ggc Gly	tca Ser	aaa Lys	tct Ser 880							2640
gct Ala	gca Ala	tgt Cys	ggc Gly	ctt Leu 885	ctt Leu	gca Ala	tct Ser	tta Leu	gca Ala 890	gaa Glu	gcc Ala	tct Ser	agt Ser	aaa Lys 895	gtg Val							2688
cac His	agc Ser	gaa Glu	cac His	gga Gly	gtt Val	ccg Pro	gca Ala	tca Ser	ttt Phe	aag Lys	gtt Val	cca Pro	act Thr	gga Gly	gtt Val							2736

BCS 04-5006_OK1 Verringerte Aktivität_SEQUENZPROTOKOLL.ST25
900 905 910

gtc ata cct ttt gga tcg atg gaa tta gct tta aag caa aat aat tcg Val Ile Pro Phe Gly Ser Met Glu Leu Ala Leu Lys Gln Asn Asn Ser 915 920 925	2784
gaa gaa aag ttt gcg tct ttg cta gaa aaa cta gaa acc gcc aga cct Glu Glu Lys Phe Ala Ser Leu Leu Glu Lys Leu Glu Thr Ala Arg Pro 930 935 940	2832
gag ggt ggt gag cta gac gac ata tgt gac cag atc cat gaa gtg atg Glu Gly Gly Glu Leu Asp Asp Ile Cys Asp Gln Ile His Glu Val Met 945 950 955 960	2880
aaa acg ttg caa gtg cct aaa gaa aca atc aac agc ata agc aaa gcg Lys Thr Leu Gln Val Pro Lys Glu Thr Ile Asn Ser Ile Ser Lys Ala 965 970 975	2928
ttt ctc aaa gat gct cgt ctc att gtt cgt tca agt gct aac gtc gag Phe Leu Lys Asp Ala Arg Leu Ile Val Arg Ser Ser Ala Asn Val Glu 980 985 990	2976
gac tta gcc gga atg tca gct gca gga ctc tat gaa tca atc cct aac Asp Leu Ala Gly Met Ser Ala Ala Gly Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Asn 995 1000 1005	3024
gtg agt ccc tcg gat cct ttg gtg ttt tca gat tcg gtt tgc caa Val Ser Pro Ser Asp Pro Leu Val Phe Ser Asp Ser Val Cys Gln 1010 1015 1020	3069
gtt tgg gct tct ctc tac aca aga aga gct gtt cta agc cgt aga Val Trp Ala Ser Leu Tyr Thr Arg Arg Ala Val Leu Ser Arg Arg 1025 1030 1035	3114
gct gct ggt gtc tct caa aga gaa gct tca atg gct gtt ctc gtt Ala Ala Gly Val Ser Gln Arg Glu Ala Ser Met Ala Val Leu Val 1040 1045 1050	3159
caa gaa atg ctt tcg ccg gac tta tca ttc gtt ctg cac aca gtg Gln Glu Met Leu Ser Pro Asp Leu Ser Phe Val Leu His Thr Val 1055 1060 1065	3204
agt cca gct gat ccg gac agt aac ctt gtg gaa gcc gag atc gct Ser Pro Ala Asp Pro Asp Ser Asn Leu Val Glu Ala Glu Ile Ala 1070 1075 1080	3249
cct ggt tta ggt gag act tta gct tca gga aca aga gga aca cca Pro Gly Leu Gly Glu Thr Leu Ala Ser Gly Thr Arg Gly Thr Pro 1085 1090 1095	3294
tgg aga ctc gct tcg ggt aag ctc gac ggg att gta caa acc tta Trp Arg Leu Ala Ser Gly Lys Leu Asp Gly Ile Val Gln Thr Leu 1100 1105 1110	3339
gct ttc gca aac ttc agc gaa gag ctt ctt gtg tca gga aca ggt Ala Phe Ala Asn Phe Ser Glu Glu Leu Leu Val Ser Gly Thr Gly 1115 1120 1125	3384
cct gct gat gga aaa tac gtt cgg ttg acc gtg gac tat agc aaa Pro Ala Asp Gly Lys Tyr Val Arg Leu Thr Val Asp Tyr Ser Lys 1130 1135 1140	3429
aaa cgt tta act gtt gac tcg gtg ttt aga cag cag ctc ggt cag Lys Arg Leu Thr Val Asp Ser Val Phe Arg Gln Gln Leu Gly Gln 1145 1150 1155	3474
aga ctc ggt tcg gtt ggt ttc ttc ttg gaa aga aac ttt ggc tgt Arg Leu Gly Ser Val Gly Phe Phe Leu Glu Arg Asn Phe Gly Cys 1160 1165 1170	3519

1170

3564

3591

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Val Gly Asn Asp Asp Asp Val Gly Asp Gly Gly His Glu Arg Asp Asn

His Asp Val Gly Asp Asp Arg Val Val Gly Ser Glu Asn Gly Ala Gln
195 200 205

Leu Gln Lys Ser Thr Leu Gly Gly Gln Trp Gln Gly Lys Asp Ala Ser
210 215 220

Phe Met Arg Ser Asn Asp His Gly Asn Arg Glu Val Gly Arg Asn Trp
225 230 235 240

Asp Thr Ser Gly Leu Glu Gly Thr Ala Leu Lys Met Val Glu Gly Asp
245 250 255

Arg Asn Ser Lys Asn Trp Trp Arg Lys Leu Glu Met Val Arg Glu Val
260 265 270

Ile Val Gly Ser Val Glu Arg Glu Glu Arg Leu Lys Ala Leu Ile Tyr
275 280 285

Ser Ala Ile Tyr Leu Lys Trp Ile Asn Thr Gly Gln Ile Pro Cys Phe
290 295 300

Glu Asp Gly Gly His His Arg Pro Asn Arg His Ala Glu Ile Ser Arg
305 310 315 320

Leu Ile Phe Arg Glu Leu Glu His Ile Cys Ser Lys Lys Asp Ala Thr
325 330 335

Pro Glu Glu Val Leu Val Ala Arg Lys Ile His Pro Cys Leu Pro Ser
340 345 350

Phe Lys Ala Glu Phe Thr Ala Ala Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg Asp
355 360 365

Ile Ala His Arg Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile Lys
370 375 380

His Thr Ile Gln Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp Leu
385 390 395 400

Ile Ala Thr Glu Ala Met Leu Gln Arg Ile Thr Glu Thr Pro Gly Lys
405 410 415

Tyr Ser Gly Asp Phe Val Glu Gln Phe Lys Ile Phe His Asn Glu Leu
420 425 430

Lys Asp Phe Phe Asn Ala Gly Ser Leu Thr Glu Gln Leu Asp Ser Met
435 440 445

Lys Ile Ser Met Asp Asp Arg Gly Leu Ser Ala Leu Asn Leu Phe Phe
Seite 7

450

455

460

Glu Cys Lys Lys Arg Leu Asp Thr Ser Gly Glu Ser Ser Asn Val Leu
 465 470 475 480

Glu Leu Ile Lys Thr Met His Ser Leu Ala Ser Leu Arg Glu Thr Ile
 485 490 495

Ile Lys Glu Leu Asn Ser Gly Leu Arg Asn Asp Ala Pro Asp Thr Ala
 500 505 510

Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile Gly Leu Glu Asp
 515 520 525

Tyr Phe Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Leu Asn Ala Leu Glu Thr Met
 530 535 540

Gly Gly Ala Asp Gln Leu Ala Lys Asp Val Gly Ser Arg Asn Val Ala
 545 550 555 560

Ser Trp Asn Asp Pro Leu Asp Ala Leu Val Leu Gly Val His Gln Val
 565 570 575

Gly Leu Ser Gly Trp Lys Gln Glu Glu Cys Leu Ala Ile Gly Asn Glu
 580 585 590

Leu Leu Ala Trp Arg Glu Arg Asp Leu Leu Glu Lys Glu Gly Glu Glu
 595 600 605

Asp Gly Lys Thr Ile Trp Ala Met Arg Leu Lys Ala Thr Leu Asp Arg
 610 615 620

Ala Arg Arg Leu Thr Ala Glu Tyr Ser Asp Leu Leu Leu Gln Ile Phe
 625 630 635 640

Pro Pro Asn Val Glu Ile Leu Gly Lys Ala Leu Gly Ile Pro Glu Asn
 645 650 655

Ser Val Lys Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile Arg Ala Gly Ile Ile Phe
 660 665 670

Gln Ile Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Leu Lys Ala Val Arg Asn Ser
 675 680 685

Leu Gly Ser Glu Gly Trp Asp Val Val Val Pro Gly Ser Thr Ser Gly
 690 695 700

Thr Leu Val Gln Val Glu Ser Ile Val Pro Gly Ser Leu Pro Ala Thr
 705 710 715 720

Ser Gly Gly Pro Ile Ile Leu Leu Val Asn Lys Ala Asp Gly Asp Glu

Glu Val Ser Ala Ala Asn Gly Asn Ile Ala Gly Val Met Leu Leu Gln
740 745 750

Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg Gln Glu Lys
755 760 765

Ile Val Phe Val Thr Cys Asp Asp Asp Asp Lys Val Ala Asp Ile Arg
770 775 780

Arg Leu Val Gly Lys Phe Val Arg Leu Glu Ala Ser Pro Ser His Val
785 790 795 800

Asn Leu Ile Leu Ser Thr Glu Gly Arg Ser Arg Thr Ser Lys Ser Ser
805 810 815

Ala Thr Lys Lys Thr Asp Lys Asn Ser Leu Ser Lys Lys Lys Thr Asp
820 825 830

Lys Lys Ser Leu Ser Ile Asp Asp Glu Glu Ser Lys Pro Gly Ser Ser
835 840 845

Ser Ser Asn Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Lys Asp Ile Pro Ser Gly Gly
850 855 860

Ile Ile Ala Leu Ala Asp Ala Asp Val Pro Thr Ser Gly Ser Lys Ser
865 870 875 880

Ala Ala Cys Gly Leu Leu Ala Ser Leu Ala Glu Ala Ser Ser Lys Val
885 890 895

His Ser Glu His Gly Val Pro Ala Ser Phe Lys Val Pro Thr Gly Val
900 905 910

Val Ile Pro Phe Gly Ser Met Glu Leu Ala Leu Lys Gln Asn Asn Ser
915 920 925

Glu Glu Lys Phe Ala Ser Leu Leu Glu Lys Leu Glu Thr Ala Arg Pro
930 935 940

Glu Gly Gly Glu Leu Asp Asp Ile Cys Asp Gln Ile His Glu Val Met
945 950 955 960

Lys Thr Leu Gln Val Pro Lys Glu Thr Ile Asn Ser Ile Ser Lys Ala
965 970 975

Phe Leu Lys Asp Ala Arg Leu Ile Val Arg Ser Ser Ala Asn Val Glu
980 985 990

Asp Leu Ala Gly Met Ser Ala Ala Gly Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Asn
Seite 9

Val	Ser	Pro	Ser	Asp	Pro	Leu	Val	Phe	Ser	Asp	Ser	Val	Cys	Gln
1010						1015					1020			
Val	Trp	Ala	Ser	Leu	Tyr	Thr	Arg	Arg	Ala	Val	Leu	Ser	Arg	Arg
1025						1030					1035			
Ala	Ala	Gly	Val	Ser	Gln	Arg	Glu	Ala	Ser	Met	Ala	Val	Leu	Val
1040						1045					1050			
Gln	Glu	Met	Leu	Ser	Pro	Asp	Leu	Ser	Phe	Val	Leu	His	Thr	Val
1055						1060					1065			
Ser	Pro	Ala	Asp	Pro	Asp	Ser	Asn	Leu	Val	Glu	Ala	Glu	Ile	Ala
1070						1075					1080			
Pro	Gly	Leu	Gly	Glu	Thr	Leu	Ala	Ser	Gly	Thr	Arg	Gly	Thr	Pro
1085						1090					1095			
Trp	Arg	Leu	Ala	Ser	Gly	Lys	Leu	Asp	Gly	Ile	Val	Gln	Thr	Leu
1100						1105					1110			
Ala	Phe	Ala	Asn	Phe	Ser	Glu	Glu	Leu	Leu	Val	Ser	Gly	Thr	Gly
1115						1120					1125			
Pro	Ala	Asp	Gly	Lys	Tyr	Val	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Tyr	Ser	Lys
1130						1135					1140			
Lys	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Ser	Val	Phe	Arg	Gln	Gln	Leu	Gly	Gln
1145						1150					1155			
Arg	Leu	Gly	Ser	Val	Gly	Phe	Phe	Leu	Glu	Arg	Asn	Phe	Gly	Cys
1160						1165					1170			
Ala	Gln	Asp	Val	Glu	Gly	Cys	Leu	Val	Gly	Glu	Asp	Val	Tyr	Ile
1175						1180					1185			
Val	Gln	Ser	Arg	Pro	Gln	Pro	Leu							
1190						1195								

<210> 3
<211> 3644
<212> DNA
<213> Oryza sativa

<220>
<221> CDS

<222> (13)..(3633)

<223>

<400> 3

cgaggaggat	ca	atg	acg	tcg	ctg	cgg	ccc	ctc	gaa	acc	tcg	ctc	tcc	ata	51	
		Met	Thr	Ser	Leu	Arg	Pro	Leu	Glu	Thr	Ser	Leu	Ser	Ile		
		1				5					10					
ggc	ggc	agg	ccg	cgc	cgt	ggt	ctc	gtc	ctc	ccg	ccg	ccc	gga	gtc	ggt	99
Gly	Gly	Arg	Pro	Arg	Arg	Gly	Leu	Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Gly	Val	Gly	
	15					20				25						
gcg	ggt	gtg	ctg	ctc	cgc	cgg	gga	gcg	atg	gcg	ctc	cct	ggg	cgg	cgc	147
Ala	Gly	Val	Leu	Leu	Arg	Arg	Gly	Ala	Met	Ala	Leu	Pro	Gly	Arg	Arg	
30					35					40					45	
ggc	ttc	gcg	tgc	cgc	ggg	aga	tcc	gcg	gcc	tcg	gcg	gca	gag	aga	aca	195
Gly	Phe	Ala	Cys	Arg	Gly	Arg	Ser	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Glu	Arg	Thr	
				50				55						60		
aag	gag	aaa	aag	aga	aga	gat	tct	tca	aag	cag	cca	ttg	gtg	cat	ctc	243
Lys	Glu	Lys	Lys	Arg	Arg	Asp	Ser	Ser	Lys	Gln	Pro	Leu	Val	His	Leu	
			65					70					75			
cag	gtt	tgt	cta	gag	cac	cag	gtt	aag	ttt	ggt	gag	cat	gta	ggc	att	291
Gln	Val	Cys	Leu	Glu	His	Gln	Val	Lys	Phe	Gly	Glu	His	Val	Gly	Ile	
		80					85					90				
atc	ggt	tcc	aca	aag	gag	ctt	ggt	tca	tgg	gag	gag	cag	gtt	gaa	ctg	339
Ile	Gly	Ser	Thr	Lys	Glu	Leu	Gly	Ser	Trp	Glu	Glu	Gln	Val	Glu	Leu	
	95					100				105						
gaa	tgg	act	aca	aat	ggt	tgg	gtc	tgc	cag	ctt	aag	ctc	cct	gga	gaa	387
Glu	Trp	Thr	Thr	Asn	Gly	Trp	Val	Cys	Gln	Leu	Lys	Leu	Pro	Gly	Glu	
110					115					120					125	
aca	ctt	gtg	gag	ttt	aaa	ttt	gtt	ata	ttt	ttg	gtg	gga	gga	aaa	gat	435
Thr	Leu	Val	Glu	Phe	Lys	Phe	Val	Ile	Phe	Leu	Val	Gly	Gly	Lys	Asp	
				130					135					140		
aaa	ata	tgg	gaa	gat	ggt	aat	aac	cgt	gtt	gtt	gag	ctg	ccg	aag	gat	483
Lys	Ile	Trp	Glu	Asp	Gly	Asn	Asn	Arg	Val	Val	Glu	Leu	Pro	Lys	Asp	
			145					150					155			
ggt	aag	ttt	gat	ata	gta	tgc	cac	tgg	aat	aga	aca	gaa	gag	cca	tta	531
Gly	Lys	Phe	Asp	Ile	Val	Cys	His	Trp	Asn	Arg	Thr	Glu	Glu	Pro	Leu	
		160					165					170				
gaa	ctt	tta	gga	aca	cca	aag	ttt	gag	ttg	gtc	gga	gaa	gct	gaa	aag	579
Glu	Leu	Leu	Gly	Thr	Pro	Lys	Phe	Glu	Leu	Val	Gly	Glu	Ala	Glu	Lys	
	175					180					185					
aat	act	ggc	gag	gat	gct	tca	gca	tct	gta	act	ttt	gca	cct	gaa	aaa	627
Asn	Thr	Gly	Glu	Asp	Ala	Ser	Ala	Ser	Val	Thr	Phe	Ala	Pro	Glu	Lys	
190					195					200					205	
gtt	caa	gat	att	tca	gtt	gtt	gag	aat	ggt	gat	cca	gca	cca	gag	gcc	675
Val	Gln	Asp	Ile	Ser	Val	Val	Glu	Asn	Gly	Asp	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	
				210					215					220		
gag	tca	agc	aaa	ttt	ggt	ggg	caa	tgg	caa	gga	agt	aaa	act	gtt	ttc	723
Glu	Ser	Ser	Lys	Phe	Gly	Gly	Gln	Trp	Gln	Gly	Ser	Lys	Thr	Val	Phe	
			225					230					235			

BCS 04-5006_OK1 Verringerte Aktivität_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

atg	aga	tca	aat	gag	cat	ctg	aat	aag	gag	gct	gat	agg	atg	tgg	gat	771
Met	Arg	Ser	Asn	Glu	His	Leu	Asn	Lys	Glu	Ala	Asp	Arg	Met	Trp	Asp	
		240					245					250				
aca	act	ggg	ctt	gat	gga	ata	gca	ctg	aaa	ctg	gtg	gag	ggc	gat	aaa	819
Thr	Thr	Gly	Leu	Asp	Gly	Ile	Ala	Leu	Lys	Leu	Val	Glu	Gly	Asp	Lys	
	255					260					265					
gca	tcc	agg	aac	tgg	tgg	cgg	aag	tta	gag	gtt	gtt	cgc	ggg	ata	ttg	867
Ala	Ser	Arg	Asn	Trp	Trp	Arg	Lys	Leu	Glu	Val	Val	Arg	Gly	Ile	Leu	
	270				275					280					285	
tca	gaa	tct	ttt	gat	gac	cag	agt	cgt	ctg	ggg	gcc	ctt	gta	tac	tca	915
Ser	Glu	Ser	Phe	Asp	Asp	Gln	Ser	Arg	Leu	Gly	Ala	Leu	Val	Tyr	Ser	
				290					295					300		
gct	att	tat	ctg	aag	tgg	att	tat	aca	ggg	cag	ata	tcg	tgc	ttt	gaa	963
Ala	Ile	Tyr	Leu	Lys	Trp	Ile	Tyr	Thr	Gly	Gln	Ile	Ser	Cys	Phe	Glu	
			305					310					315			
gat	ggg	ggc	cac	cat	cgg	cct	aac	aaa	cat	gct	gag	ata	tcg	agg	caa	1011
Asp	Gly	Gly	His	His	Arg	Pro	Asn	Lys	His	Ala	Glu	Ile	Ser	Arg	Gln	
		320					325					330				
ata	ttc	cgt	gaa	ctt	gaa	atg	atg	tat	tat	ggg	aaa	acc	aca	tca	gcc	1059
Ile	Phe	Arg	Glu	Leu	Glu	Met	Met	Tyr	Tyr	Gly	Lys	Thr	Thr	Ser	Ala	
	335					340					345					
aag	gat	gtt	ctc	gtg	att	cgc	aaa	att	cat	ccc	ttt	tta	cct	tca	ttt	1107
Lys	Asp	Val	Leu	Val	Ile	Arg	Lys	Ile	His	Pro	Phe	Leu	Pro	Ser	Phe	
	350				355					360					365	
aag	tca	gag	ttt	aca	gcc	tct	gtc	cct	cta	aca	cga	att	cgt	gat	att	1155
Lys	Ser	Glu	Phe	Thr	Ala	Ser	Val	Pro	Leu	Thr	Arg	Ile	Arg	Asp	Ile	
				370				375						380		
gct	cac	cgg	aat	gac	atc	cca	cat	gat	ctc	aag	caa	gaa	atc	aag	cat	1203
Ala	His	Arg	Asn	Asp	Ile	Pro	His	Asp	Leu	Lys	Gln	Glu	Ile	Lys	His	
			385					390					395			
act	ata	caa	aac	aaa	ctt	cat	cgt	aat	gct	gga	cct	gag	gat	ctt	att	1251
Thr	Ile	Gln	Asn	Lys	Leu	His	Arg	Asn	Ala	Gly	Pro	Glu	Asp	Leu	Ile	
		400					405					410				
gct	aca	gaa	gtc	atg	ctt	gct	agg	att	act	aag	acc	cct	gga	gaa	tac	1299
Ala	Thr	Glu	Val	Met	Leu	Ala	Arg	Ile	Thr	Lys	Thr	Pro	Gly	Glu	Tyr	
	415					420					425					
agt	gaa	aca	ttt	gtt	gaa	caa	ttc	acg	ata	ttt	tat	agc	gaa	cta	aaa	1347
Ser	Glu	Thr	Phe	Val	Glu	Gln	Phe	Thr	Ile	Phe	Tyr	Ser	Glu	Leu	Lys	
	430				435					440					445	
gat	ttc	ttc	aat	gct	ggc	agc	cta	ttt	gag	caa	ctg	gag	tcc	atc	aag	1395
Asp	Phe	Phe	Asn	Ala	Gly	Ser	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Glu	Ser	Ile	Lys	
				450					455					460		
gaa	tct	ctg	aac	gag	tca	ggc	tta	gaa	gtt	ctc	tca	tcc	ttt	gtg	gaa	1443
Glu	Ser	Leu	Asn	Glu	Ser	Gly	Leu	Glu	Val	Leu	Ser	Ser	Phe	Val	Glu	
			465					470					475			
acc	aaa	agg	agt	ttg	gac	caa	gtg	gat	cat	gca	gaa	gat	ttg	gat	aaa	1491
Thr	Lys	Arg	Ser	Leu	Asp	Gln	Val	Asp	His	Ala	Glu	Asp	Leu	Asp	Lys	
		480					485					490				
aat	gat	acc	att	caa	att	ttg	atg	act	acc	ttg	caa	tca	tta	tct	tct	1539
Asn	Asp	Thr	Ile	Gln	Ile	Leu	Met	Thr	Thr	Leu	Gln	Ser	Leu	Ser	Ser	
	495					500					505					

BCS 04-5006_OK1 Verringerte Aktivität_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

cta	aga	tcg	ggt	cta	atg	aag	ggc	ctt	gaa	agt	ggc	ctt	aga	aat	gat	1587
Leu	Arg	Ser	Val	Leu	Met	Lys	Gly	Leu	Glu	Ser	Gly	Leu	Arg	Asn	Asp	
510				515				520						525		
gcg	cct	gat	aat	gct	ata	gca	atg	cga	caa	aag	tgg	cgc	ctt	tgt	gaa	1635
Ala	Pro	Asp	Asn	Ala	Ile	Ala	Met	Arg	Gln	Lys	Trp	Arg	Leu	Cys	Glu	
				530				535						540		
att	agt	ctt	gag	gat	tat	tca	ttt	ggt	ctg	tta	agc	aga	ttc	atc	aat	1683
Ile	Ser	Leu	Glu	Asp	Tyr	Ser	Phe	Val	Leu	Leu	Ser	Arg	Phe	Ile	Asn	
			545					550					555			
act	ctt	gaa	gcc	tta	ggt	gga	tca	gct	tca	ctt	gca	aag	gat	gta	gct	1731
Thr	Leu	Glu	Ala	Leu	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Lys	Asp	Val	Ala	
		560					565					570				
aga	aat	act	act	cta	tgg	gat	act	act	ctt	gat	gcc	ctt	gtc	att	ggc	1779
Arg	Asn	Thr	Thr	Leu	Trp	Asp	Thr	Thr	Leu	Asp	Ala	Leu	Val	Ile	Gly	
	575					580					585					
atc	aat	caa	ggt	agc	ttt	tca	ggg	tgg	aaa	aca	gat	gaa	tgt	att	gcc	1827
Ile	Asn	Gln	Val	Ser	Phe	Ser	Gly	Trp	Lys	Thr	Asp	Glu	Cys	Ile	Ala	
				595						600					605	
ata	ggg	aat	gag	att	ctt	tcc	tgg	aag	caa	aaa	ggt	cta	tct	gaa	agt	1875
Ile	Gly	Asn	Glu	Ile	Leu	Ser	Trp	Lys	Gln	Lys	Gly	Leu	Ser	Glu	Ser	
				610					615					620		
gaa	ggt	tgt	gaa	gat	ggg	aaa	tat	att	tgg	tca	cta	aga	ctt	aaa	gct	1923
Glu	Gly	Cys	Glu	Asp	Gly	Lys	Tyr	Ile	Trp	Ser	Leu	Arg	Leu	Lys	Ala	
			625					630					635			
aca	ctg	gac	aga	gca	cgg	aga	tta	acg	gaa	gag	tac	tct	gaa	gca	ctt	1971
Thr	Leu	Asp	Arg	Ala	Arg	Arg	Leu	Thr	Glu	Glu	Tyr	Ser	Glu	Ala	Leu	
		640					645					650				
ctt	tct	ata	ttc	cct	gaa	aaa	gta	atg	ggt	att	ggg	aaa	gcc	ctt	gga	2019
Leu	Ser	Ile	Phe	Pro	Glu	Lys	Val	Met	Val	Ile	Gly	Lys	Ala	Leu	Gly	
	655					660					665					
ata	cca	gat	aac	agt	gtg	aga	act	tac	aca	gag	gca	gaa	att	cgt	gct	2067
Ile	Pro	Asp	Asn	Ser	Val	Arg	Thr	Tyr	Thr	Glu	Ala	Glu	Ile	Arg	Ala	
	670				675					680					685	
ggc	att	ggt	ttt	cag	gta	tct	aaa	cta	tgc	aca	gta	ctt	cag	aaa	gca	2115
Gly	Ile	Val	Phe	Gln	Val	Ser	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Leu	Gln	Lys	Ala	
				690					695					700		
att	cga	gaa	gta	ctt	gga	tca	act	ggc	tgg	gat	ggt	ctt	ggt	cct	gga	2163
Ile	Arg	Glu	Val	Leu	Gly	Ser	Thr	Gly	Trp	Asp	Val	Leu	Val	Pro	Gly	
			705					710					715			
gtg	gcc	cat	gga	act	ctg	atg	cgg	gtg	gaa	aga	att	ctt	cct	gga	tca	2211
Val	Ala	His	Gly	Thr	Leu	Met	Arg	Val	Glu	Arg	Ile	Leu	Pro	Gly	Ser	
		720					725					730				
tta	cct	tca	tct	gtc	aaa	gaa	cct	gtg	ggt	cta	att	gta	gat	aag	gct	2259
Leu	Pro	Ser	Ser	Val	Lys	Glu	Pro	Val	Val	Leu	Ile	Val	Asp	Lys	Ala	
	735					740					745					
gat	gga	gat	gaa	gag	gtc	aaa	gct	gct	ggg	gat	aat	ata	ggt	ggg	ggt	2307
Asp	Gly	Asp	Glu	Glu	Val	Lys	Ala	Ala	Gly	Asp	Asn	Ile	Val	Gly	Val	
				755					760						765	
att	ctt	ctt	cag	gaa	cta	cct	cac	ctt	tca	cat	ctt	ggt	ggt	aga	gct	2355
Ile	Leu	Leu	Gln	Glu	Leu	Pro	His	Leu	Ser	His	Leu	Gly	Val	Arg	Ala	
				770					775					780		

BCS 04-5006_OK1 verringerte Aktivität_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

cgt	caa	gag	aat	gtt	gta	ttt	gta	act	tgt	gaa	tat	gat	gac	aca	gtt	2403
Arg	Gln	Glu	Asn	Val	Val	Phe	Val	Thr	Cys	Glu	Tyr	Asp	Asp	Thr	Val	
			785					790					795			
aca	gat	gtg	tat	ttg	ctt	gag	gga	aaa	tat	atc	aga	tta	gaa	gca	tca	2451
Thr	Asp	Val	Tyr	Leu	Leu	Glu	Gly	Lys	Tyr	Ile	Arg	Leu	Glu	Ala	Ser	
		800					805					810				
tcc	atc	aat	gtc	aat	ctc	tca	ata	gtt	tca	gaa	aaa	aat	gac	aat	gct	2499
Ser	Ile	Asn	Val	Asn	Leu		Ile	Val	Ser	Glu	Lys	Asn	Asp	Asn	Ala	
	815					820					825					
gtc	tct	aca	gaa	cca	aat	agt	aca	ggg	aat	cca	ttt	caa	cag	aaa	ctc	2547
Val	Ser	Thr	Glu	Pro	Asn	Ser	Thr	Gly	Asn	Pro	Phe	Gln	Gln	Lys	Leu	
830					835					840					845	
caa	aat	gaa	ttc	tct	cta	cca	tcg	gat	atc	gag	atg	cca	ctg	caa	atg	2595
Gln	Asn	Glu	Phe	Ser	Leu	Pro	Ser	Asp	Ile	Glu	Met	Pro	Leu	Gln	Met	
				850					855					860		
tct	aag	caa	aaa	agc	aaa	tca	gga	gtg	aat	ggg	agt	ttt	gct	gct	ctt	2643
Ser	Lys	Gln	Lys	Ser	Lys	Ser	Gly	Val	Asn	Gly	Ser	Phe	Ala	Ala	Leu	
			865					870					875			
gag	ctt	tca	gaa	gct	tca	gtg	gaa	tca	gct	ggg	gca	aaa	gct	gct	gca	2691
Glu	Leu	Ser	Glu	Ala	Ser	Val	Glu	Ser	Ala	Gly	Ala	Lys	Ala	Ala	Ala	
		880					885					890				
tgc	aga	act	ctt	tct	gtt	ctt	gct	tca	ttg	tct	aat	aaa	gtc	tat	agt	2739
Cys	Arg	Thr	Leu	Ser	Val	Leu	Ala	Ser	Leu	Ser	Asn	Lys	Val	Tyr	Ser	
	895					900					905					
gat	caa	gga	gtt	cca	gca	gcc	ttt	aga	gtc	cct	tct	ggg	gct	gtg	ata	2787
Asp	Gln	Gly	Val	Pro	Ala	Ala	Phe	Arg	Val	Pro	Ser	Gly	Ala	Val	Ile	
910					915					920					925	
cca	ttt	gga	tca	atg	gag	gat	gcg	ctc	aag	aaa	agt	gga	tca	ctg	gaa	2835
Pro	Phe	Gly	Ser	Met	Glu	Asp	Ala	Leu	Lys	Lys	Ser	Gly	Ser	Leu	Glu	
				930					935					940		
tcc	ttt	aca	agc	ctt	cta	gaa	aag	att	gaa	aca	gcc	aaa	gtc	gaa	aat	2883
Ser	Phe	Thr	Ser	Leu	Leu	Glu	Lys	Ile	Glu	Thr	Ala	Lys	Val	Glu	Asn	
			945					950					955			
ggg	gaa	gtt	gat	agc	ctg	gcg	ttg	gag	cta	caa	gca	ata	att	tca	cat	2931
Gly	Glu	Val	Asp	Ser	Leu	Ala	Leu	Glu	Leu	Gln	Ala	Ile	Ile	Ser	His	
		960					965					970				
ctt	tcc	cca	ccg	gag	gag	act	att	ata	ttt	ctc	aaa	aga	atc	ttc	cca	2979
Leu	Ser	Pro	Pro	Glu	Glu	Thr	Ile	Ile	Phe	Leu	Lys	Arg	Ile	Phe	Pro	
	975					980					985					
cag	gat	gtc	cgg	ttg	att	gtt	aga	tct	agt	gct	aat	gtg	gag	gat	ttg	3027
Gln	Asp	Val	Arg	Leu	Ile	Val	Arg	Ser	Ser	Ala	Asn	Val	Glu	Asp	Leu	
990					995					1000					1005	
gct	ggg	atg	tca	gct	gct	ggg	ctc	tat	gat	tca	att	ccc	aat	gtc		3072
Ala	Gly	Met	Ser	Ala	Ala	Gly	Leu	Tyr	Asp	Ser	Ile	Pro	Asn	Val		
				1010					1015					1020		
agt	ctc	atg	gac	cca	tgt	gcc	ttt	gga	gct	gcg	gtt	ggg	aag	gtt		3117
Ser	Leu	Met	Asp	Pro	Cys	Ala	Phe	Gly	Ala	Ala	Val	Gly	Lys	Val		
				1025					1030					1035		
tgg	gct	tct	tta	tac	aca	agg	aga	gcc	atc	cta	agc	cgt	cga	gcc		3162
Trp	Ala	Ser	Leu	Tyr	Thr	Arg	Arg	Ala	Ile	Leu	Ser	Arg	Arg	Ala		
				1040					1045					1050		

BCS 04-5006_OK1 Verringerte Aktivität_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

gct ggt gtt tat cag	aga gac gcg aca atg	gct gtt ctt gtc caa	3207
Ala Gly Val Tyr	Arg Asp Ala Thr Met	Ala Val Leu Val Gln	
1055	1060	1065	
gaa ata ctg cag cca	gat ctc tcc ttc gtg	ctt cat act gtt tgc	3252
Glu Ile Leu Gln Pro	Asp Leu Ser Phe Val	Leu His Thr Val Cys	
1070	1075	1080	
ccc gct gac cat gac	ccc aag gtt gtc cag	gct gag gtc gcc cct	3297
Pro Ala Asp His Asp	Pro Lys Val Val Gln	Ala Glu Val Ala Pro	
1085	1090	1095	
ggg ctg ggt gaa acg	ctt gct tca gga acc	cg t ggc acc ccg tgg	3342
Gly Leu Gly Glu Thr	Leu Ala Ser Gly Thr	Arg Gly Thr Pro Trp	
1100	1105	1110	
agg ctg tca tgt aac	aaa ttc gat gga aaa	gtt gcc act ctt gcc	3387
Arg Leu Ser Cys Asn	Lys Phe Asp Gly Lys	Val Ala Thr Leu Ala	
1115	1120	1125	
ttt tca aat ttc agt	gag gag atg gtg gtg	cac aac tct ggt cct	3432
Phe Ser Asn Phe Ser	Glu Glu Met Val Val	His Asn Ser Gly Pro	
1130	1135	1140	
gcc aat gga gaa gta	att cgt ctt act gtt	gat tac agc aag aag	3477
Ala Asn Gly Glu Val	Ile Arg Leu Thr Val	Asp Tyr Ser Lys Lys	
1145	1150	1155	
cca ttg tcg gtt gat	aca acc ttt agg aag	cag ttt ggt cag cga	3522
Pro Leu Ser Val Asp	Thr Thr Phe Arg Lys	Gln Phe Gly Gln Arg	
1160	1165	1170	
ctg gct gcg att ggc	cag tat ctg gag cag	aag ttc ggg agt gca	3567
Leu Ala Ala Ile Gly	Gln Tyr Leu Glu Gln	Lys Phe Gly Ser Ala	
1175	1180	1185	
cag gat gtg gaa ggt	tgc ctg gtt ggg aaa	gat att ttt ata gtg	3612
Gln Asp Val Glu Gly	Cys Leu Val Gly Lys	Asp Ile Phe Ile Val	
1190	1195	1200	
caa agc agg cca cag	cca tag aagccgaatt c		3644
Gln Ser Arg Pro Gln	Pro		
1205			

<210> 4

<211> 1206

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 4

Met Thr Ser Leu Arg Pro Leu Glu Thr Ser Leu Ser Ile Gly Gly Arg
1 5 10 15

Pro Arg Arg Gly Leu Val Leu Pro Pro Pro Gly Val Gly Ala Gly Val
20 25 30

Leu Leu Arg Arg Gly Ala Met Ala Leu Pro Gly Arg Arg Gly Phe Ala
35 40 45

BCS 04-5006_OK1 Verringerte Aktivität_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Cys Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Ala Ala Glu Arg Thr Lys Glu Lys
 50 55 60
 Lys Arg Arg Asp Ser Ser Lys Gln Pro Leu Val His Leu Gln Val Cys
 65 70 75 80
 Leu Glu His Gln Val Lys Phe Gly Glu His Val Gly Ile Ile Gly Ser
 85 90 95
 Thr Lys Glu Leu Gly Ser Trp Glu Glu Gln Val Glu Leu Glu Trp Thr
 100 105 110
 Thr Asn Gly Trp Val Cys Gln Leu Lys Leu Pro Gly Glu Thr Leu Val
 115 120 125
 Glu Phe Lys Phe Val Ile Phe Leu Val Gly Gly Lys Asp Lys Ile Trp
 130 135 140
 Glu Asp Gly Asn Asn Arg Val Val Glu Leu Pro Lys Asp Gly Lys Phe
 145 150 155 160
 Asp Ile Val Cys His Trp Asn Arg Thr Glu Glu Pro Leu Glu Leu Leu
 165 170 175
 Gly Thr Pro Lys Phe Glu Leu Val Gly Glu Ala Glu Lys Asn Thr Gly
 180 185 190
 Glu Asp Ala Ser Ala Ser Val Thr Phe Ala Pro Glu Lys Val Gln Asp
 195 200 205
 Ile Ser Val Val Glu Asn Gly Asp Pro Ala Pro Glu Ala Glu Ser Ser
 210 215 220
 Lys Phe Gly Gly Gln Trp Gln Gly Ser Lys Thr Val Phe Met Arg Ser
 225 230 235 240
 Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Ala Asp Arg Met Trp Asp Thr Thr Gly
 245 250 255
 Leu Asp Gly Ile Ala Leu Lys Leu Val Glu Gly Asp Lys Ala Ser Arg
 260 265 270
 Asn Trp Trp Arg Lys Leu Glu Val Val Arg Gly Ile Leu Ser Glu Ser
 275 280 285
 Phe Asp Asp Gln Ser Arg Leu Gly Ala Leu Val Tyr Ser Ala Ile Tyr
 290 295 300
 Leu Lys Trp Ile Tyr Thr Gly Gln Ile Ser Cys Phe Glu Asp Gly Gly
 305 310 315 320

His His Arg Pro Asn Lys His Ala Glu Ile Ser Arg Gln Ile Phe Arg
 325 330 335

Glu Leu Glu Met Met Tyr Tyr Gly Lys Thr Thr Ser Ala Lys Asp Val
 340 345 350

Leu Val Ile Arg Lys Ile His Pro Phe Leu Pro Ser Phe Lys Ser Glu
 355 360 365

Phe Thr Ala Ser Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg Asp Ile Ala His Arg
 370 375 380

Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile Lys His Thr Ile Gln
 385 390 395 400

Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp Leu Ile Ala Thr Glu
 405 410 415

Val Met Leu Ala Arg Ile Thr Lys Thr Pro Gly Glu Tyr Ser Glu Thr
 420 425 430

Phe Val Glu Gln Phe Thr Ile Phe Tyr Ser Glu Leu Lys Asp Phe Phe
 435 440 445

Asn Ala Gly Ser Leu Phe Glu Gln Leu Glu Ser Ile Lys Glu Ser Leu
 450 455 460

Asn Glu Ser Gly Leu Glu Val Leu Ser Ser Phe Val Glu Thr Lys Arg
 465 470 475 480

Ser Leu Asp Gln Val Asp His Ala Glu Asp Leu Asp Lys Asn Asp Thr
 485 490 495

Ile Gln Ile Leu Met Thr Thr Leu Gln Ser Leu Ser Ser Leu Arg Ser
 500 505 510

Val Leu Met Lys Gly Leu Glu Ser Gly Leu Arg Asn Asp Ala Pro Asp
 515 520 525

Asn Ala Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile Ser Leu
 530 535 540

Glu Asp Tyr Ser Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Ile Asn Thr Leu Glu
 545 550 555 560

Ala Leu Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Lys Asp Val Ala Arg Asn Thr
 565 570 575

Thr Leu Trp Asp Thr Thr Leu Asp Ala Leu Val Ile Gly Ile Asn Gln
 580 585 590

BCS 04-5006_OK1 Verringerte Aktivität_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Val Ser Phe Ser Gly Trp Lys Thr Asp Glu Cys Ile Ala Ile Gly Asn
595 600 605

Glu Ile Leu Ser Trp Lys Gln Lys Gly Leu Ser Glu Ser Glu Gly Cys
610 615 620

Glu Asp Gly Lys Tyr Ile Trp Ser Leu Arg Leu Lys Ala Thr Leu Asp
625 630 635 640

Arg Ala Arg Arg Leu Thr Glu Glu Tyr Ser Glu Ala Leu Leu Ser Ile
645 650 655

Phe Pro Glu Lys Val Met Val Ile Gly Lys Ala Leu Gly Ile Pro Asp
660 665 670

Asn Ser Val Arg Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile Arg Ala Gly Ile Val
675 680 685

Phe Gln Val Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Gln Lys Ala Ile Arg Glu
690 695 700

Val Leu Gly Ser Thr Gly Trp Asp Val Leu Val Pro Gly Val Ala His
705 710 715 720

Gly Thr Leu Met Arg Val Glu Arg Ile Leu Pro Gly Ser Leu Pro Ser
725 730 735

Ser Val Lys Glu Pro Val Val Leu Ile Val Asp Lys Ala Asp Gly Asp
740 745 750

Glu Glu Val Lys Ala Ala Gly Asp Asn Ile Val Gly Val Ile Leu Leu
755 760 765

Gln Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg Gln Glu
770 775 780

Asn Val Val Phe Val Thr Cys Glu Tyr Asp Asp Thr Val Thr Asp Val
785 790 795 800

Tyr Leu Leu Glu Gly Lys Tyr Ile Arg Leu Glu Ala Ser Ser Ile Asn
805 810 815

Val Asn Leu Ser Ile Val Ser Glu Lys Asn Asp Asn Ala Val Ser Thr
820 825 830

Glu Pro Asn Ser Thr Gly Asn Pro Phe Gln Gln Lys Leu Gln Asn Glu
835 840 845

Phe Ser Leu Pro Ser Asp Ile Glu Met Pro Leu Gln Met Ser Lys Gln
850 855 860

BCS 04-5006_OK1 Verringerte Aktivität_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Lys Ser Lys Ser Gly Val Asn Gly Ser Phe Ala Ala Leu Glu Leu Ser
865 870 875 880

Glu Ala Ser Val Glu Ser Ala Gly Ala Lys Ala Ala Ala Cys Arg Thr
885 890 895

Leu Ser Val Leu Ala Ser Leu Ser Asn Lys Val Tyr Ser Asp Gln Gly
900 905 910

Val Pro Ala Ala Phe Arg Val Pro Ser Gly Ala Val Ile Pro Phe Gly
915 920 925

Ser Met Glu Asp Ala Leu Lys Lys Ser Gly Ser Leu Glu Ser Phe Thr
930 935 940

Ser Leu Leu Glu Lys Ile Glu Thr Ala Lys Val Glu Asn Gly Glu Val
945 950 955 960

Asp Ser Leu Ala Leu Glu Leu Gln Ala Ile Ile Ser His Leu Ser Pro
965 970 975

Pro Glu Glu Thr Ile Ile Phe Leu Lys Arg Ile Phe Pro Gln Asp Val
980 985 990

Arg Leu Ile Val Arg Ser Ser Ala Asn Val Glu Asp Leu Ala Gly Met
995 1000 1005

Ser Ala Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Ile Pro Asn Val Ser Leu Met
1010 1015 1020

Asp Pro Cys Ala Phe Gly Ala Ala Val Gly Lys Val Trp Ala Ser
1025 1030 1035

Leu Tyr Thr Arg Arg Ala Ile Leu Ser Arg Arg Ala Ala Gly Val
1040 1045 1050

Tyr Gln Arg Asp Ala Thr Met Ala Val Leu Val Gln Glu Ile Leu
1055 1060 1065

Gln Pro Asp Leu Ser Phe Val Leu His Thr Val Cys Pro Ala Asp
1070 1075 1080

His Asp Pro Lys Val Val Gln Ala Glu Val Ala Pro Gly Leu Gly
1085 1090 1095

Glu Thr Leu Ala Ser Gly Thr Arg Gly Thr Pro Trp Arg Leu Ser
1100 1105 1110

Cys Asn Lys Phe Asp Gly Lys Val Ala Thr Leu Ala Phe Ser Asn
1115 1120 1125

BCS 04-5006_OK1 Verringerte Aktivität_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Phe Ser Glu Glu Met Val Val His Asn Ser Gly Pro Ala Asn Gly
1130 1135 1140

Glu Val Ile Arg Leu Thr Val Asp Tyr Ser Lys Lys Pro Leu Ser
1145 1150 1155

Val Asp Thr Thr Phe Arg Lys Gln Phe Gly Gln Arg Leu Ala Ala
1160 1165 1170

Ile Gly Gln Tyr Leu Glu Gln Lys Phe Gly Ser Ala Gln Asp Val
1175 1180 1185

Glu Gly Cys Leu Val Gly Lys Asp Ile Phe Ile Val Gln Ser Arg
1190 1195 1200

Pro Gln Pro
1205

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> Oryza sativa, Arabidopsis thaliana

<400> 5

Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg
1 5 10

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> solanum tuberosum

<400> 6

Pro Glu Glu Cys Lys Ala Val Gly Asn
1 5

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> solanum tuberosum

<400> 7

BCS 04-5006_OK1 verringerte Aktivität_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Thr Glu Glu Tyr Ser Glu Thr
1 5

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Solanum tuberosum

<400> 8

Arg Phe Val Asn Ala Val Glu
1 5

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Solanum tuberosum

<400> 9

Glu Gly Ser Glu Asp Gly Lys
1 5

<210> 10

<211> 403

<212> DNA

<213> Solanum tuberosum

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(402)

<223>

<400> 10
gcg gat gct tca ata gct atg cgt cag aag tgg cgt ctc tgc gaa atc 48
Ala Asp Ala Ser Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile
1 5 10 15

ggg ctt gaa gac tat gca ttt gtt ctt ttg agc agg ttt gtg aat gca 96
Gly Leu Glu Asp Tyr Ala Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Val Asn Ala
20 25 30

gtt gaa gct cta ggc gga gct gat tgg ctt gca gag aat gta aca gtg 144
Val Glu Ala Leu Gly Gly Ala Asp Trp Leu Ala Glu Asn Val Thr Val

aaa aac att agt tct tgg aat gat cca att gga gca ctt aca gtt gga 192
Lys Asn Ile Ser Ser Trp Asn Asp Pro Ile Gly Ala Leu Thr Val Gly
50 55 60

atc caa cag cta ggt ata tct ggt tgg aag ccc gag gaa tgc aaa gct 240
Ile Gln Gln Leu Gly Ile Ser Gly Trp Lys Pro Glu Glu Cys Lys Ala
65 70 75 80

gtt gga aat gaa ctt ttg tca tgg aaa gaa agg ggt att tca gaa att 288
Val Gly Asn Glu Leu Leu Ser Trp Lys Glu Arg Gly Ile Ser Glu Ile
85 90 95

gaa ggc agc gaa gat ggt aag act ata tgg gca tta aga cta aaa gcg 336
Glu Gly Ser Glu Asp Gly Lys Thr Ile Trp Ala Leu Arg Leu Lys Ala
100 105 110

act ctt gat aga agt cga agg tta act gag gag tat tcc gag aca ctt 384
Thr Leu Asp Arg Ser Arg Arg Leu Thr Glu Glu Tyr Ser Glu Thr Leu
115 120 125

ctc caa ata ttc cct gaa a 403
Leu Gln Ile Phe Pro Glu
130

<210> 11

<211> 134

<212> PRT

<213> Solanum tuberosum

<400> 11

Ala Asp Ala Ser Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile
1 5 10 15

Gly Leu Glu Asp Tyr Ala Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Val Asn Ala
20 25 30

Val Glu Ala Leu Gly Gly Ala Asp Trp Leu Ala Glu Asn Val Thr Val
35 40 45

Lys Asn Ile Ser Ser Trp Asn Asp Pro Ile Gly Ala Leu Thr Val Gly
50 55 60

Ile Gln Gln Leu Gly Ile Ser Gly Trp Lys Pro Glu Glu Cys Lys Ala
65 70 75 80

Val Gly Asn Glu Leu Leu Ser Trp Lys Glu Arg Gly Ile Ser Glu Ile
85 90 95

Glu Gly Ser Glu Asp Gly Lys Thr Ile Trp Ala Leu Arg Leu Lys Ala
100 105 110

Thr Leu Asp Arg Ser Arg Arg Leu Thr Glu Glu Tyr Ser Glu Thr Leu
Seite 22

BCS 04-5006_OK1 Verringerte Aktivität_SEQUENZPROTOKOLL.ST25
115 120 125

Leu Gln Ile Phe Pro Glu
130

